

STRUKTUR UND FUNKTION DER ETHYLBENZOL DEHYDROGENASE, EINER ANAEROBEN KOHLENWASSERSTOFF-HYDROXYLASE

Von dem Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Diplom Biologin

Corina Hagel

aus Heilbronn

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Heider

Mitbetrichterstatter: Prof. Dr. F. Pfeifer

Tag der Einreichung: 08.09.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2006

Darmstadt 2006

D17

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von August 2003 bis Juli 2005 am Institut für Biologie II der Biologischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. und von Juli 2005 bis Juni 2006 an der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. Johann Heider durchgeführt.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

D. P. KLOER, C. HAGEL, J. HEIDER and G. E. SCHULZ (2006). Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Biochemistry* **14**: 1377-88.

M. SZALENIEC, C. HAGEL, M. MENKE, P. NOWAK, M. WITKO and J. HEIDER (2006). Catalytic versatility and kinetics of oxygen-independent hydrocarbon-hydroxylation by ethylbenzene dehydrogenase, an enzyme of potential use for biotransformation reactions. (wird bei *Biochemistry* eingereicht).

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
EINLEITUNG.....	3
1. Übergangsmetalle.....	3
2. Molybdänenzyme.....	3
3. Die Familie der einkernigen Molybdänenzyme.....	5
4. Die DMSO-Reduktase Familie.....	5
5. Ethylbenzol Dehydrogenase.....	8
6. Anaerober Abbau von Ethylbenzol.....	9
7. Die Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	11
8. Zielsetzung der Arbeit.....	13
MATERIAL UND METHODEN.....	14
1. Bakterienstämme und Materialien	14
1.1. Bakterienstämme.....	14
1.2. Verwendete Plasmide und Oligonukleotide.....	14
1.3. Biochemikalien.....	15
1.4. Chemikalien und Gase	15
1.5. Gase.....	15
1.6. Chromatographiematerial.....	15
1.7. Material für Klonierung und Expression.....	16
2. Biochemische Methoden.....	16
2.1. Züchtung von Bakterien und Herstellung von Zellextrakten	16
2.1.1. Anzucht von <i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN-1 auf Ethylbenzol.....	16
2.1.2. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	19
2.2. Stammkulturhaltung	19
2.3. Herstellung von Zellextrakten.....	20
2.4. Enzymatische Tests.....	20
2.4.1. Enzymtest zur Bestimmung der Ethylbenzol Dehydrogenase Aktivität.....	20
2.4.2. Enzymtest zur Bestimmung der Benzoylacetat-CoA Ligase Aktivität.....	21
2.5. Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	22
2.6. Fällungen.....	23
2.6.1. Ammoniumsulfat-Fällung	23
2.6.2. Trichloressigsäurefällung.....	23
2.7. Elektrophoretische Methoden	24

2.7.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	24
2.7.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.8. Protein-Konzentrationsbestimmung.....	27
2.8.1. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	27
2.8.2. Spektroskopische Methode nach Granum und Whitaker.....	27
2.9. Protein-Kristallisation	27
2.9.1. Probenvorbereitung.....	28
2.9.2. „Microbatch“-Technik	28
2.9.3. „Hanging-drop“-Technik	28
2.9.3. „Sitting-drop“-Technik	28
2.9.5. Auswertung der Kristallisationsansätze	28
2.9.6. Kristallisation der Ethylbenzol-Dehydrogenase	29
2.9.7. Einfrieren der Ethylbenzol Dehydrogenase Kristalle	29
2.9.8. Röntgenstrukturanalyse.....	29
2.10. Inhibitionskinetische Untersuchungen	30
2.10.1. Vorbereitung der Proben für Inaktivierungskinetiken	30
2.10.2. Aktivitätstest für Inhibitionskinetiken	31
2.10.3. Auswertung der Inhibitionskinetikdaten.....	32
2.11. Spektroskopische Methoden	33
2.11.1. UV/VIS Spektroskopie	33
2.11.2. Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie	33
3. Chemische Methoden.....	34
3.1. Bestimmung der Wasserstoffperoxid Konzentration durch Manganometrie.....	34
3.2. Herstellung von Benzoylacetat.....	35
4. Biophysikalische Methoden.....	35
4.1. Redoxtitration.....	35
4.2. Elektrochemisch induzierte Redox-Differenzspektroskopie.....	38
5. Molekularbiologische Methoden	39
5.1. Isolierung chromosomaler DNA (nach Thomson und Murray 1980).....	39
5.2. Isolierung von Plasmid-DNA.....	39
5.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)	40
5.4. DNA-Fällung.....	41
5.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen (Gelelution)	42
5.6. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter DNA	42
5.7. Klonierungstechniken.....	43
5.8. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	43
5.9. Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	43

5.10. Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	44
5.11. Elektroporation.....	44
5.12. <i>In-vivo</i> -Überexpression plasmidcodierter Gene in <i>E. coli</i>	44
5.12.1. Klonierung der Benzoylacetat-CoA Ligase	44
5.12.2. Überproduktion der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase in <i>E. coli</i>	45
6. Sequenzanalyse	45

ERGEBNISSE46

1. Die Kristallstruktur der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	46
1.1. Kristallisierung der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	46
1.1.1. Kristallisierung durch die „Microbatch“-Technik	46
1.1.2. Kristallisierung durch die „Hanging-drop“-Technik	46
1.1.3. Kristallisierung durch die „Sitting-drop“-Technik.....	47
1.1.4. Optimierung der initialen Kristallisationsbedingungen	47
1.1.5. Entnehmen und Einfrieren der Kristalle	48
1.2 Röntgenstrukturanalyse.....	49
1.3. Die Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	52
2. Kinetik der Ethylbenzol Dehydrogenase	55
2.1. Substratspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	55
2.2. Inhibitorspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	56
2.2.1. Inhibition durch Substrat-ähnliche Verbindungen	56
2.2.2. Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Ferricyanid	59
2.2.3. Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Wasserstoffperoxid	60
2.2.4. Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Stickstoffmonoxid	62
2.3. Inhibitionskinetiken.....	64
2.3.1. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Toluol.....	65
2.3.2. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 1-(2-Naphtyl)ethanol	66
2.3.3. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch (<i>S</i>)-1-Phenylethanol	67
2.3.4. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 1,2-Diethylbenzol	68
2.3.5. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 2-Ethylthiophenol	69
2.3.6. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 4-Ethylpyridin.....	70
2.3.7. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Anisol.....	71
2.4. Temperaturabhängigkeit der Ethylbenzol Dehydrogenase	72
3. Spektroskopische Analyse der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	74
3.1. UV-Vis spektroskopische Analyse der nicht-inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase.....	74

3.1.1. UV-Vis spektroskopische Analyse unter reduzierenden Bedingungen	75
3.1.2. UV-Vis spektroskopische Analyse unter oxidierenden Bedingungen	75
3.2. Elektronenspinresonanz-Analyse der nicht-inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase ..	77
3.2.1. Elektronenspinresonanz-Analyse unter oxidierenden Bedingungen	77
3.2.2. Elektronenspinresonanz-Analyse nach Oxidation mit Ferrizenium	79
3.2.3. Elektronenspinresonanz Analyse unter reduzierenden Bedingungen	81
3.3. Spektroskopische Analyse der inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase	82
3.3.1. Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das UV-Vis Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	82
3.3.2. Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	83
3.3.3. Einfluss von Stickstoffmonoxid auf das UV-Vis Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	85
3.3.4. Einfluss von Stickstoffmonoxid auf das ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	86
4. Redoxtitration der Ethylbenzol Dehydrogenase	89
4.1. Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase	90
4.1.1. Erster Reduktionsschritt von + 219 mV bis -38 mV	93
4.1.2. Zweiter Reduktionsschritt von -38 mV bis -462 mV	95
4.2. Redoxpotential des Redoxmediators Benzylviologen-Dichlorid.....	99
4.3. Redoxpotential des Molybdäns im Molybdopterin-Dinukleotid Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	100
5. Bestimmung des Redoxpotentials des Häm b-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase	103
6. Herstellung von „Broad-Host-Range“-Vektoren zur Klonierung der Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	107
7. Rekombinante Produktion der Benzoylacetat-CoA Ligase	112
7.1. Klonierung des postulierten Gens der Benzoylacetat-CoA Ligase	112
7.2. Überproduktion von Bal _{N-HP-Thio/C-His6}	113
7.3. Optimierung der Überproduktionsbedingungen von Bal _{N-HP-Thio/C-His6}	116
7.4. Aktivität der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase	118
DISKUSSION	119
1. Die Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase	119
1.1. Die Alpha Untereinheit	119
1.2. Die Beta-Untereinheit	125

1.3. Die Gamma-Untereinheit	128
1.4. Das aktive Zentrum und die Katalyse	131
1.5. Elektronentransport	133
1.6. Vergleich der Ethylbenzol Dehydrogenase mit Nitratreduktase.....	135
 2. Die Funktion der Ethylbenzol Dehydrogenase	 137
2.1. Die Katalyse der Ethylbenzol Dehydrogenase	137
2.2. Die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die Ethylbenzol Dehydrogenase	143
2.3. Die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Ethylbenzol Dehydrogenase	145
2.4. Die Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase: Redox- und spektroskopische Eigenschaften	 145
2.4.1. Die Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	145
2.4.2. Der Molybdän-Kofaktor und der Häm b-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase.....	 148
 3. Verwendung der Broad-Host-Range-Hybridvektoren pBBR1- MCS4/pTrc99a/NdeI und pBBR1-MCS4/pTrc99a/NcoI	 149
 4. Die rekombinante Benzoylacetat-CoA Ligase - Bal _{N-HP-Thio/C-His6}	 149
 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	 150
 LITERATURVERZEICHNIS	 152
 DANKSAGUNG	 165

STRUCTURE AND FUNCTION OF ETHYLBENZENE DEHYDROGENASE, AN ANAEROBIC HYDROCARBON HYDROXYLASE

Ethylbenzene dehydrogenase is the initial key enzyme of the anaerobic ethylbenzene degradation pathway in denitrifying beta-proteobacterium *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1. The enzyme is a molybdenum enzyme and belongs to DMSO reductase family. It catalyses an oxygen-independent and stereospecific hydroxylation of ethylbenzene to (*S*)-1-phenylethanol. Until now the anaerobic oxidation of an aromatic hydrocarbon is an unique reaction. In the subsequent ethylbenzene degradation pathway, (*S*)-1-phenylethanol is oxidised to acetophenone, followed by carboxylation to benzoylacetate. Activation of this compound to the corresponding CoA-thioester by a CoA-ligase and thiolyl cleavage of benzoylacetyl-CoA leads to a central intermediate of anaerobic aromatic-pathway, benzoyl-CoA, and acetyl-CoA. In this work, ethylbenzene dehydrogenase was crystallised and the structure of enzyme was determined. Furthermore, redox active cofactors of the enzyme were specified and redox potentials were identified. A first reaction mechanism was postulated from detailed substrate and inhibition studies. In addition, a vector for cloning genes of ethylbenzene dehydrogenase was constructed to perform future mutation studies. Finally, the enzyme benzoyl-CoA ligase was overproduced recombinantly with a His-tag in *Escherichia coli*. In detail, the following results were obtained:

- 1) Ethylbenzene dehydrogenase is a periplasmic enzyme and consists of three subunits, alpha, beta and gamma. The enzyme was crystallised anaerobically and its structure was solved at a resolution of 1,88 Å. The architecture of cofactors is similar to those of respiratory nitrate reductase NarGHI of *Escherichia coli*. The alpha subunit harbors the catalytic center with one molybdenum, which is coordinated by two molybdopterin guanine dinucleotids, one of which has an unusual open pyrane ring. Electrons are transported via five iron-sulfur clusters (FS0-FS4), one of which (FS0) is located in the alpha subunit while the others (FS1-FS4) are located in the beta subunit. Iron-sulfur cluster (FS0), which is located nearby the active site exhibits an unusual histidine ligand. Terminal electron acceptor is a heme *b* cofactor, which is located in the gamma subunit. It is the first heme cofactor with methionine and lysine as axial ligands.
- 2) From the analysis of substrate and inhibitor spectrum and detailed inhibition kinetics studies of new and already known inhibitors of ethylbenzene dehydrogenase new findings concerning the reaction mechanism of enzyme were obtained. Ethylbenzene dehydrogenase is an enzyme, which possesses a broad spectrum of approximately 20 substrates and 22 inhibitors, respectively. Among the inhibitors, both mixed and competitive inhibitors with strong affinity to the active site of the enzyme have been

found.

- 3) Cofactors of ethylbenzene dehydrogenase were analysed in detail via UV-Vis- and electron spin resonance spectroscopy. Thereby, one [3Fe-4S]-cluster, three of four [4Fe-4S]-clusters, one molybdenum cofactor and one heme *b* cofactor were identified and characterised. In addition, redox potentials of single cofactors of ethylbenzene dehydrogenase were defined. Midpoint redox potentials were determined as +223 mV ($\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$), +82 mV ($\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$) for the molybdenum redox pairs; -15 mV (FS1), <-400 mV (FS2), -8 mV (FS3), -70 mV (FS4) for iron-sulfur clusters and +256 mV for heme *b*.
- 4) Reduced ethylbenzene dehydrogenase is oxygen-sensitive and loses its activity within a halftime of 7 minutes. Inhibition and spectroscopic studies have proved that the potential oxygen metabolite hydrogen peroxide inactivates the enzyme and damages cofactors of the enzyme. In addition, interaction of nitric oxide with cofactors of ethylbenzene dehydrogenase was demonstrated.
- 5) For future studies with recombinant ethylbenzene dehydrogenase, a “broad-host-range” hybrid vector has been constructed. Therewith, the genes of ethylbenzene dehydrogenase may be overproduced not only in *Escherichia coli* but in other organisms like the genus *Aromatoleum*.
- 6) To simplify the complex purification scheme of benzoylacetyl-CoA ligase from *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1, the gene of benzoylacetyl-CoA ligase *bal* was expressed with a C-terminal his-tag in *Escherichia coli*. The soluble and functionally active benzoylacetyl-CoA ligase can now be purified via affinity chromatography.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist das initiale Schlüsselenzym des anaeroben Ethylbenzol Abbauweges im dentrifizierenden Beta-Proteobakterium *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1. Das Enzym ist ein Molybdänenzym und gehört zur DMSO-Reduktase Familie. Es katalysiert die Sauerstoff-unabhängige und stereospezifische Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (*S*)-1-Phenylethanol. Hierbei handelt es sich um eine bisher einzigartige Reaktion, die anaerobe Oxidation eines aromatischen Kohlenwasserstoffes. Im nachfolgenden Ethylbenzol-Abbauweg wird (*S*)-1-Phenylethanol zu Acetophenon oxidiert, welches anschließend zu Benzoylacetat carboxyliert wird. Eine Aktivierung von Benzoylacetat zum korrespondierenden CoA-Thioester durch eine CoA-Ligase und eine thiolytische Spaltung von Benzoylacetyl-CoA führt abschließend zu einem zentralen Intermediat des anaeroben Aromaten-Metabolismus, Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ethylbenzol Dehydrogenase kristallisiert und die Struktur des Enzyms aufgeklärt. Darüber hinaus wurden die redoxaktiven Kofaktoren des Enzyms genauer charakterisiert und ihre Redoxpotentiale bestimmt. Über detaillierte Substrat- und Inhibitorstudien wurde ein erster Reaktionsmechanismus postuliert. Des weiteren wurde ein Vektor für die Klonierung der Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase für zukünftige Mutationsstudien des rekombinanten Enzyms konstruiert. Abschließend wurde das Enzym Benzoylacetat-CoA Ligase rekombinant mit einem His-Tag in *Escherichia coli* überproduziert. Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- 1) Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist ein periplasmatisches Enzym und besteht aus drei Untereinheiten, Alpha, Beta und Gamma. Das Enzym wurde anaerob kristallisiert und seine Struktur wurde bei einer Auflösung von 1,88 Å aufgeklärt. Die Architektur der Kofaktoren ist ähnlich zu denen der respiratorischen Nitratreduktase NarGHI von *Escherichia coli*. In der Alpha-Untereinheit befindet sich das katalytische Zentrum mit einem Molybdän, welches von zwei Molybdopterin-Guanin Dinukleotiden ligandiert wird, von denen einer einen offenen Pyranring besitzt. Die Elektronen werden über fünf Eisen-Schwefel-Zentren (FS0-FS4) transportiert, von welchen sich eines (FS0) in der Alpha-Untereinheit und die anderen (FS1-FS4) in der Beta Untereinheit befinden. Das Fe-S-Zentrum (FS0), welches dem aktiven Zentrum am Nächsten liegt, besitzt einen ungewöhnlichen Histidin-Liganden. Terminaler Elektronenakzeptor ist ein Häm *b*-Kofaktor, welcher sich in der Gamma-Untereinheit befindet. Hierbei handelt es sich um den ersten Häm-Kofaktor, welcher Methionin und Lysin als axiale Liganden besitzt.
- 2) Aufgrund von Untersuchungen des Substrat- und Inhibitorspektrums und das detaillierte Studium von Inhibitionskinetiken neuer und bereits bekannter Inhibitoren der Ethylbenzol

Dehydrogenase wurden neue Erkenntnisse zum Reaktionsmechanismus des Enzyms gewonnen. Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist ein Enzym, welches über ein sehr großes Spektrum von ca. 20 Substraten bzw. ca. 22 Inhibitoren verfügt. Unter den Inhibitoren befinden sich sowohl gemischte, als auch kompetitive Inhibitoren, welche eine sehr starke Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms aufweisen.

- 3) Die Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden über UV-Vis- und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie genauer analysiert. Dabei wurde die Anwesenheit eines [3Fe-4S]-, drei der vier [4Fe-4S]-Zentren, eines Molybdän- und eines Häm *b*-Kofaktors nachgewiesen. Zudem wurden die Redoxpotentiale der einzelnen Redoxzentren der Ethylbenzol Dehydrogenase bestimmt. Die Mittelpunkt-Redoxpotentiale betragen für die Molybdän-Redoxpaare: +223 mV ($\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$), +82 mV ($\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$); für die Fe-S-Zentren: -15 mV (FS1), < -400 mV (FS2), -8 mV (FS3), -70 mV (FS4) und für den Häm *b*-Kofaktor: +256 mV.
- 4) Die reduzierte Ethylbenzol Dehydrogenase ist sauerstoffempfindlich und verliert innerhalb einer Halbwertszeit von 7 Minuten ihre Aktivität. Über Inhibitions- und Spektroskopiestudien wurde nachgewiesen, dass der mögliche Sauerstoffmetabolit Wasserstoffperoxid das Enzym inaktiviert und Kofaktoren des Enzyms beschädigt. Auch die niedermolekulare Verbindung Stickstoffmonoxid wirkt als Inhibitor und möglicherweise als Inaktivator des Enzyms. Zusätzlich wurde für Stickstoffmonoxid eine Interaktion mit den Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase nachgewiesen.
- 5) Für zukünftige Mutationsstudien mit rekombinanter Ethylbenzol Dehydrogenase wurde ein „Broad-Host-Range“-Hybridvektor hergestellt, mit welchem die Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase nicht nur in *Escherichia coli*, sondern auch in anderen Organismen, wie zum Beispiel der Gattung *Aromatoleum* überproduziert werden können.
- 6) Aufgrund der schwierigen Reinigung der Benzoylacetat-CoA Ligase aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1, wurde das Gen der Benzoylacetat-CoA Ligase *bal* in *Escherichia coli* mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert. Die lösliche und funktionelle aktive rekombinante Benzoylacetat-CoA Ligase kann nun durch Affinitätschromatographie einfach aufgereinigt werden.

EINLEITUNG

1. Übergangsmetalle

Eine Vielzahl von Übergangsmetallen haben ihren Weg in biologische Systeme gefunden (Hille, 2002). Durch diese kann bei Enzymen eine größere katalytische Vielfalt erreicht werden, als nur mit den funktionellen Gruppen der Aminosäuren-Seitenketten allein. Während Übergangsmetalle häufig durch direkte Koordination an Histidin-, Serin- oder Tyrosin-Resten gebunden sind, können sie auch als Teil einer größeren, prosthetischen Gruppe vorkommen, welche eine organische Komponente enthält. Ein Beispiel hierfür sind Häm-Proteine, die ein Eisenatom innerhalb eines Porphyrinringes besitzen. Im Gegensatz zu Eisen bildet das Übergangsmetall Molybdän nur einen geringen Bestandteil der Erdkruste. Das Verhältnis von Eisen zu Molybdän in der Erdkruste beträgt 3000:1. Trotzdem ist Molybdän für biologische Systeme gut verfügbar, da Molybdat-Salze stark wasserlöslich sind. Aus diesem Grund liegt auch die Verfügbarkeit von Molybdän in Meerwasser bei einer fünffach höheren Konzentration als diejenige von Eisen (Hille, 1999). Das Metall ist redoxaktiv und kann bei den Molybdo-Enzymen (ausgenommen Nitrogenase) in drei unterschiedlichen Oxidationszuständen (IV, V und VI) vorliegen. Dadurch ermöglicht es den Elektronentransfer von biologischen Verbindungen, welche obligatorische Zwei-Elektronenüberträger sind (z.B. NADH), auf obligatorische Ein-Elektronenüberträger (z.B. Eisen-Schwefel-Zentren und Cytochrome). Zusätzlich ist die Reduktion von Molybdän(VI) oft an simultane Protonierungsreaktionen von Metall-Liganden gekoppelt, typischerweise Mo=O oder Mo=S-Gruppen. Darüber hinaus sind Mo=O-Gruppen überraschenderweise sehr labil, und es sind zahlreiche chemische Systeme bekannt, in welchen das Metallzentrum in der Lage ist, einen Oxo-Transfer auf geeignete Akzeptoren bzw. von entsprechenden Donatoren zu katalysieren.

2. Molybdänenzyme

In Enzymen tritt Molybdän in zwei Basisformen auf: (1) als integraler Teil eines vielkernigen Molybdän-Eisen-Schwefel-Zentrums (FeMoCo) in Nitrogenase, welches für die Fixierung von atmosphärischem Stickstoff verantwortlich ist und (2) als Bestandteil einkerniger, aktiver Zentren einer sehr viel diverseren Enzymgruppe, deren Vertreter entweder physiologische Akzeptormoleküle mit Sauerstoffatomen aus Wasser hydroxylieren oder Oxogruppen von Donormolekülen abspalten und zu Wasser reduzieren (Hille, 1996). Das Molybdänatom bildet dabei zusammen mit einem speziellen Pterin-Kofaktor (Molybdopterin) einen integralen Teil des aktiven Zentrums der Molybdänenzyme. Dieser enthält normalerweise in den Enzymen einen ungewöhnlichen dritten pyranoiden Ring, der über Thiol-Substituenten das Mo-Atom bindet

(Abbildung 1). In eukaryotischen Molybdoenzymen koordinieren Schwefelatome der Dithiolengruppen das Molybdänatom mit einer Stöchiometrie von einem Molybdopterin pro Molybdän (MPT) (Kisker *et al.*, 1997; Hille, 2002). In Prokaryoten ist der Kofaktor jedoch je nach Enzym entweder als MPT oder in Form von Dinukleotiden mit Cytosin (MCD), Guanosin (MGD), Adenosin oder Inosin vor. An den Stoffwechselwegen, durch welche der Pyranopterin-Kern des Kofaktors synthetisiert wird, sind mehr als zwölf Proteine beteiligt und diese scheinen in der Biologie universell konserviert zu sein (Mendel, 1999). Das bestätigt einerseits das frühere Auftreten dieses Stoffwechselweges im Verlaufe der Evolution und andererseits die wichtige Bedeutung der Prozesses, in welchen diese Zentren beteiligt sind (Hille, 2002). Die physiologische und ökologische Rolle dieser Enzyme ist fundamental, und schließt die Katalyse von Schlüsselschritten im Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Stoffwechsel mit ein.

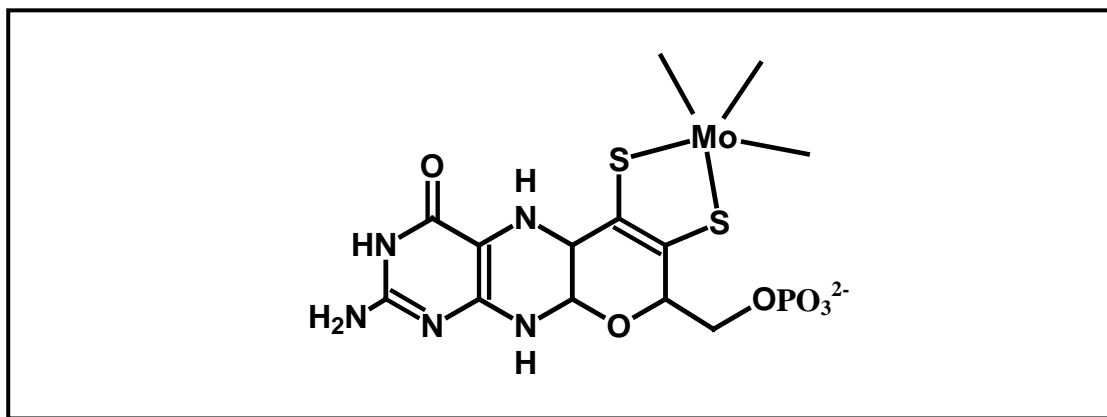


Abbildung 1: Die Struktur des Pterin-Kofaktors. Dargestellt ist die Struktur des Molybdän-Kofaktors (Mo-co), wie er in Eukaryoten zu finden ist. Er besitzt eine Phosphatgruppe an der Pterin-Seitenkette (MPT). Das Molybdänatom wird durch eine Dithiolen-Gruppe am pyranoiden Ring koordiniert.

Manche Organismen verwenden anstelle von Molybdän Wolfram für sehr ähnliche Enzyme (Hille, 2002). Solche Wolfram-Enzyme kennt man vor allem bei (hyper-)thermophilen, anaeroben Archaeobakterien (Johnson *et al.*, 1996). Unter diesen Bedingungen sind Wolfram-Schwefel-Verbindungen stabiler als Molybdän-Schwefel-Verbindungen. Darüber hinaus sind die Redoxpotentiale Wolfram-enthaltender Komplexe niedriger als diejenigen, die Molybdän enthalten, und deshalb in reduzierender Umgebung viel nützlicher.

Da Wolfram und Molybdän eine ähnliche Chemie haben, ist es möglich, dass im aktiven Zentrum von Enzymen Wolfram durch Molybdän zu dem Zeitpunkt ersetzt wurde, als in der Evolution der Umbruch zu einer sauerstoffreichen Umwelt stattfand. Die biologische Vielfalt bestätigt diese Hypothese insofern, dass Molybdän-enthaltende Enzyme eher in aeroben Organismen gefunden werden, wohingegen Wolfram-Enzyme eher in obligat, thermophilen Anaerobiern auftreten. Manche mesophile Anaerobier können, abhängig von der Verfügbarkeit und den Wachstumsbedingungen, sowohl Molybdän, als auch Wolfram verwenden. Allerdings werden die

meisten Molybdän-Enzyme durch hohe Wolfram-Konzentrationen während der Anzucht inaktiviert, weil Wolfram anstelle von Molybdän eingebaut wird.

3. Die Familien der einkernigen Molybdäenenzyme

Einkernige Molybdäenenzyme werden auf Grundlage ihrer Sequenzen und der Strukturen ihrer Molybdän-Zentren in drei unterschiedliche Familien unterteilt (Hille, 2002). Jede Familie besitzt dabei eine andere Struktur des aktiven Zentrums (Abbildung 2) und katalysiert einen unterschiedlichen Reaktionstyp. Die erste Familie wurde nach ihrem bekanntesten Vertreter benannt, der Xanthin Oxidase, die in der Kuhmilch vorkommt. Mitglieder dieser Familie kommen in allen Organismen vor und katalysieren Hydroxylierungsreaktionen mit organischen Substraten, weshalb sie auch unter dem Namen Molybdän Hydroxylasen zusammengefasst werden (Hille, 1996). Das aktive Zentrum besteht im oxidierten Zustand aus einem $\text{LMo}^{\text{IV}}\text{OS(OH)}$ -Kern, enthält einen Pterin-Kofaktor (L) pro Molybdän und wird nicht über einen Aminosäure-Liganden im Enzym gebunden. Die zweite Enzymfamilie ist die Sulfitoxidase-Familie, deren bisher bekannte Vertreter alle in Eukaryoten vorkommen. Diese Enzyme katalysieren den Transfer von Oxogruppen zwischen Wasser und anorganischen Substraten (Sulfit/Sulfat bzw. Nitrit/Nitrat) und werden deshalb auch als eukaryotische Oxotransferasen bezeichnet (Hille *et al.*, 1999; Hille, 2002). Auch bei dieser Enzymfamilie liegt im aktiven Zentrum ein Pterin-Kofaktor-Molekül pro Molybdän vor. Dieser Kofaktor ist Teil eines $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{O}_2(\text{S-Cys})$ -Kerns, dessen Cystein-Ligand durch das Polypeptid bereitgestellt wird. Die letzte Familie ist in ihrer Struktur und Funktion sehr divers, aber alle Mitglieder besitzen zwei Moleküle des Pterin-Kofaktors pro Molybdän und meist einen zusätzlichen Aminosäure-Liganden (Abbildung 2). Die erste Struktur, welche innerhalb dieser Familie aufgeklärt wurde, ist diejenige der Dimethylsulfoxid (DMSO) Reduktase, welche der Enzymfamilie ihren Namen gab.

4. Die DMSO-Reduktase Familie

Zur DMSO-Reduktase Familie gehören zahlreiche Molybdäenenzyme, die nur in Bakterien oder Archaeen vorkommen und eine beträchtliche Sequenz-Homologie ihrer katalytischen Untereinheiten aufweisen (Hille, 1996). Die Reaktionen dieser Familie umfassen Sauerstoffatom-Transfer-Reaktionen (Schultz *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1999; Pierson *et al.*, 1990; Krafft *et al.*, 1992), aber auch Reaktionen, welche ohne einen Oxo-Transfer ablaufen, wie zum Beispiel die Oxidation von Formiat zu Kohlenstoffdioxid (Khangulov *et al.*, 1998), die Vier-Elektronen-Oxidation von Phenylacetyl-CoA (Rhee *et al.*, 1999), die Reduktion von Polysulfid (Nagarajan *et al.*, 2004) reduktive (Messerschmidt *et al.*, 2004; Einsle *et al.*, 2005) und oxidative Hydroxylierungsreaktionen (Kniemeyer *et al.*, 2001a).

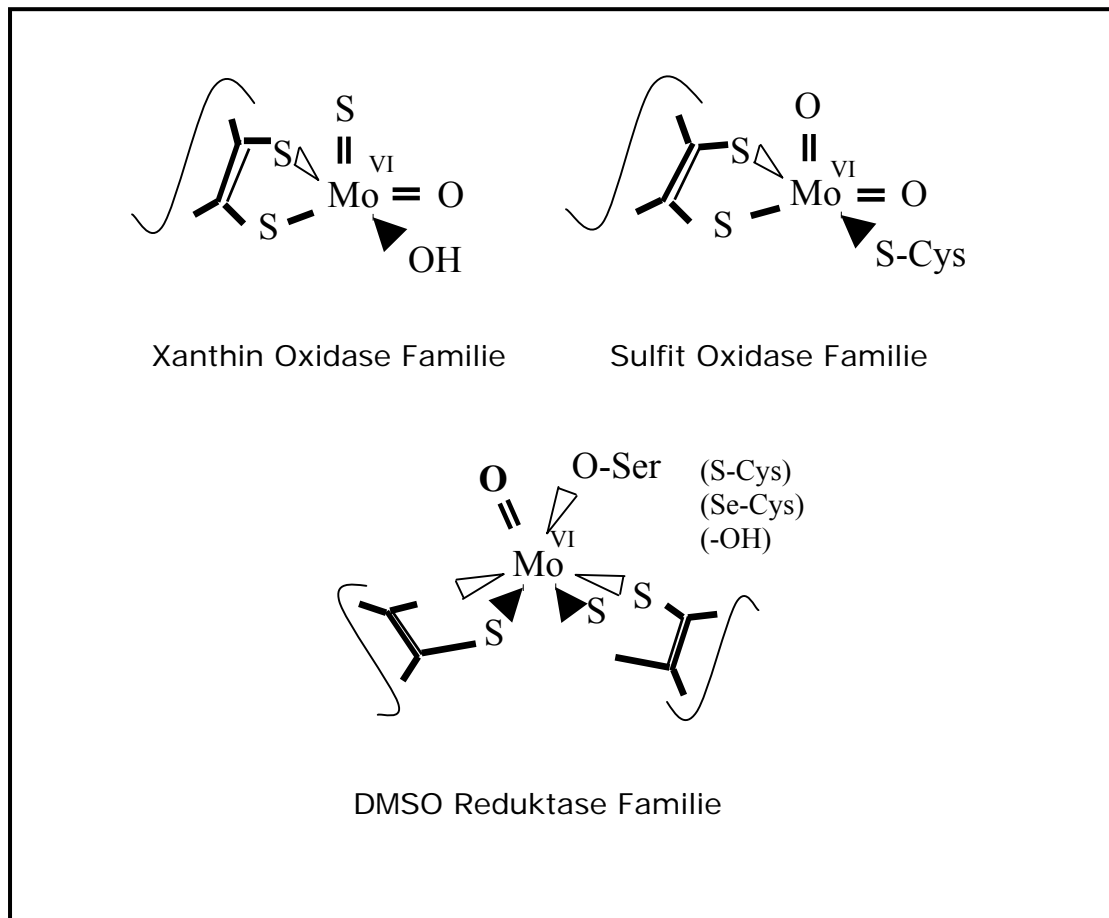


Abbildung 2: Die Familien einkerniger Molybdänenzyme. Die dargestellten Strukturen entsprechen der oxidierten Mo(VI)-Form eines jeden Enzyms. Cys, Cystein, Ser, Serin.

Aufgrund ihrer Rollen als initiale Dehydrogenasen und terminale Reduktasen in Elektronentransportketten spielen Enzyme der DMSO-Reduktase Familie eine bedeutende Rolle in anaeroben Atmungsketten von Prokaryoten (Kisker *et al.*, 1997). Beispiele für Molybdänenzyme, die in der anaeroben Atmung vorkommen, sind Formiat Dehydrogenase N, Nitratreduktasen, DMSO-Reduktasen, Polysulfid-Reduktase, Arsenatreduktase, (Per)Chloratreduktase und Selenatreduktase (McDevitt *et al.*, 2002).

Die Mitglieder der DMSO-Reduktase Familie teilen sich eine gemeinsame Gestalt ihres Molybdän-Kofaktors (Abbildung 2). Das Molybdän wird gewöhnlich durch zwei Molybdopterin-Guanindinucleotid-Kofaktoren mit insgesamt vier Thiolat-Liganden, einer einzelnen Mo=O-Gruppe und einem sechsten Liganden X (meist vom Polypeptid) im $L_2Mo^{VI}O(X)$ -Kern koordiniert und ist bekannt als Molybdän-bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (Mo-bisMGD) (McDevitt *et al.*, 2002). Der sechste Ligand X kann entweder ein Serin, (z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO) Reduktase (Schindelin *et al.*, 1996, McAlpine *et al.*, 1998), Trimethylamin N-oxid (TMAO)-Reduktase (Czjzek *et al.*, 1998)), ein Cystein (z. B. periplasmatische Nitratreduktase (Dias *et al.*, 1999)), ein Selenocystein (z. B. Formiat Dehydrogenase H (Boyington *et al.*, 1997)),

ein Aspartat (z.B. dissimilatorische Nitratreduktase (Bertero *et al.*, 2003, Jormakka *et al.*, 2004)) oder ein Hydroxid und /oder Wassermolekül (z.B. Arsenit-Oxidase (Ellis *et al.*, 2001)) sein.

Die zelluläre Lokalisation dieser Enzyme unterscheidet sich. Während manche Enzyme an der Cytoplasmamembran gebunden sind, wie zum Beispiel die respiratorische Nitratreduktase NarGHI, sind andere löslich im Cytoplasma oder im Periplasma lokalisiert.

Strukturelle Vergleiche haben gezeigt, dass die katalytischen Untereinheiten von Mo-*bis*MGD Enzymen in drei verschiedene Untertypen eingeteilt werden können, welche als Typ I, II und III bezeichnet werden (McDevitt *et al.*, 2002, Abbildung 3). Typ I –Enzyme besitzen gewöhnlich einen Cystein- bzw- Selenocystein-Liganden, aber sie schließen auch die Arsenitreduktase mit ein, die ein gebundenes Wasser enthält und anstelle des Cystein-Liganden ein Alanin in der Sequenz trägt (Ellis *et al.*, 2001; Jormakka *et al.*, 2004). Mitglieder der Typ III-Enzyme enthalten einen Molybdän-Serin-Liganden (Mo-Ser) (McDevitt *et al.*, 2002). Beispiele sind die katalytischen Untereinheiten der DMSO-Reduktase DmsA (Jormakka *et al.*, 2004) oder der TMAO-Reduktase (Czjzek *et al.*, 1998). Typ II-Enzyme besitzen einen Molybdän-Aspartat-Liganden (Mo-Asp), welcher durchgehend in allen Proteinen konserviert, wobei Sequenzen von Gram-negativen, Gram-positiven und Archaeen miteingeschlossen sind (McDevitt *et al.*, 2002). Die NarG-Untereinheit der membrangebundenen, respiratorischen Nitratreduktase von *Escherichia coli* (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004) ist die erste Untereinheit, die aufgrund ihres Molybdän-Aspartat-Liganden (Mo-Asp) den Typ-II-Enzymen zugeordnet werden kann. Insbesondere gehört auch die Ethylbenzol Dehydrogenase von *Aromatoleum aromaticum* (früher benannt als *Azoarcus sp.* Kniemeyer *et al.*, 2001a) zu dieser Unterfamilie, welche in dieser Arbeit charakterisiert wurde.

Die Strukturen einiger Mitglieder der DMSO-Reduktase Familie wurden in den vergangenen Jahren aufgeklärt. Hierzu gehören die Strukturen der Formiatreduktasen H (Boyington *et al.*, 1997) und N (Jormakka *et al.*, 2002), der DMSO-Reduktase (Schindelin *et al.*, 1996; McAlpine *et al.*, 1998), der TMAO-Reduktase (Czjzek *et al.*, 1998), der periplasmatischen Nitratreduktase NAP (Dias *et al.*, 1999) und der membrangebundenen, respiratorischen Nitratreduktase (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004).

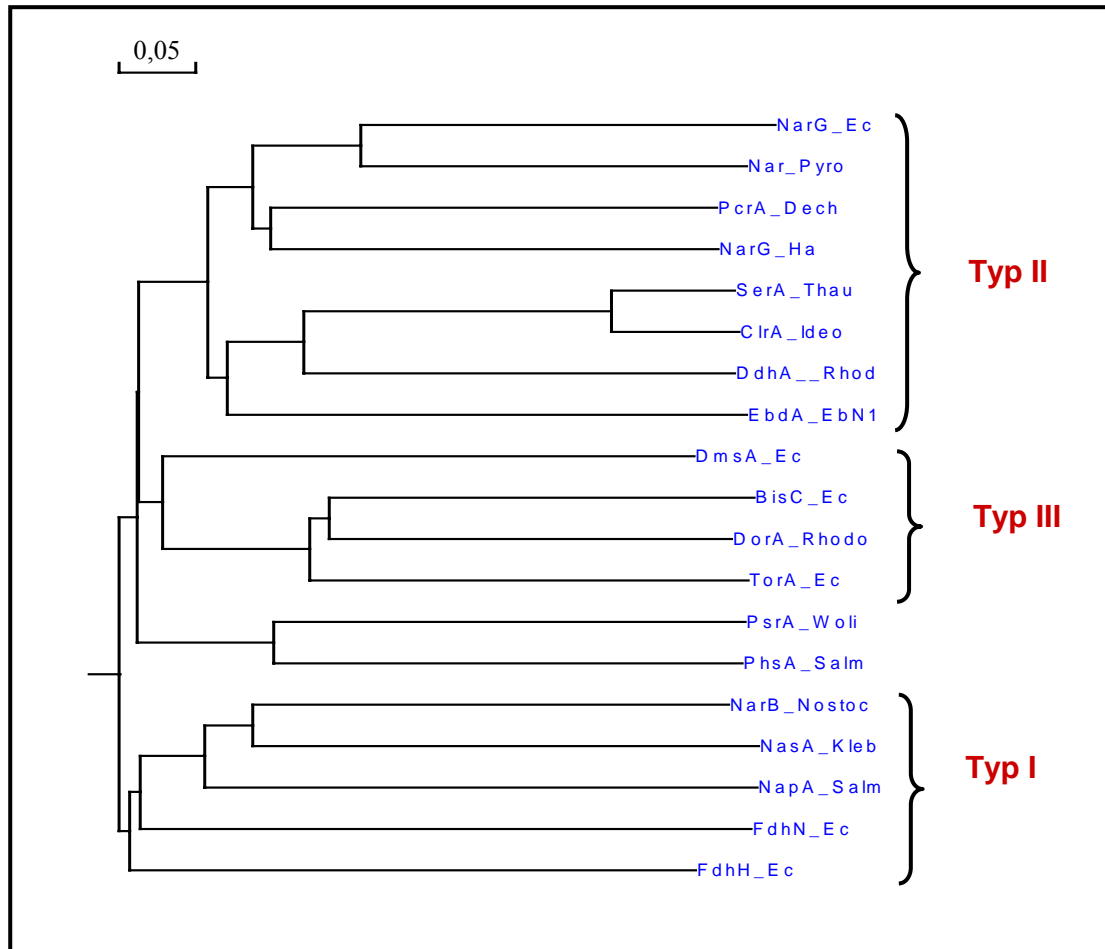


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum von Aminosäuresequenzen von Enzymen der DMSO-Reduktase Familie. Abkürzungen für Molybdän-Kofaktor-enhaltenden Untereinheiten der Proteine: DorA, Dimethylsulfoxid Reduktase; TorA, Trimethylamin-N-oxid Reduktase; BisC, Biotinsulfoxid Reduktase; NasA und NarB, assimilatorische Nitratreduktasen; NapA, periplasmatische Nitratreduktase; Fdh, Formiat Dehydrogenase; PhsA, Thiosulfatreduktase; PsrA Polysulfidreduktase; DmsA, Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktase; NarG, membrangebundene, respiratorische Nitratreduktase. Abkürzungen für Organismen: Ec, *Escherichia coli*; Rhodo, *Rhodovulum sulfidophilum*; Nostoc, *Nostocoides sp.* Stamm PCC7120; Thau, *Thauera selenatis*; Woli, *Wolinella succinogenes*, Pyro, *Pyrobaculum aerophilum str. IM2*, Ideo, *Ideonella dechloratans*, Ha, *Haloarcula marismortui*; Dech, *Dechloromonas aromatica*; EbN1, *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1. Die Polysulfidreduktase (PsrA) und Thiosulfatreduktase (PhsA) können bisher zu keiner der angegebenen Typen zugeordnet werden.

5. Ethylbenzol Dehydrogenase

Die Ethylbenzol Dehydrogenase wurde aus dem Denitrifizierer *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 isoliert, welcher früher als *Azoarcus sp.* bekannt war. Der Stamm wurde durch Kultivierung auf Rohöl unter Anwesenheit von Nitrat aus einem Süßwasser-Sediment gewonnen (Rabus *et al.*, 1995).

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist das erste bekannte Enzym, welches einen Kohlenwasserstoff in Abwesenheit von Sauerstoff oxidieren kann (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2001). Sie katalysiert damit eine Schlüsselreaktion im anaeroben Abbau von Ethylbenzol. Diese Reaktion besteht aus einem stereoselektiven Transfer einer aus Wasser stammenden Hydroxylgruppe auf die C2-Gruppe von Ethylbenzol, wobei als Produkt (*S*)-1-Phenylethanol entsteht (Abbildung 4). Sie lässt sich an künstliche Elektronenakzeptoren koppeln, wie zum Beispiel das Ferrizinium-Ion, welches ein Redoxpotential von +380 mV besitzt (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Da es sich bei der Ethylbenzol Dehydrogenase um ein periplasmatisches Molybdänenzym handelt, liegt es nahe, dass ihr natürlicher Elektronenakzeptor möglicherweise ein periplasmatisches Cytochrom c mit ähnlich hohem Redoxpotential ist. Im Gegensatz dazu besitzt das Redoxpaar 1-Phenyl-ethanol/Ethylbenzol ein niedriges Redoxpotential von $E^0 = +30 \text{ mV}$ (Kniemeyer *et al.* 2001a). Die große Redoxpotentialdifferenz zwischen Elektronendonator und -akzeptor erklärt die beobachtete Irreversibilität dieser Reaktion (Kniemeyer *et al.*, 2001a).

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist ein Heterotrimer aus drei Untereinheiten mit 96 kDa, 43 kDa und 23 kDa mit einer apparenten Masse von ca. 155 kDa. Ein ähnlicher heterotrimerer Aufbau wird bei vielen Molybdänenzymen der DMSO-Reduktase Familie gefunden (Johnson *et al.*, 2001). Die Alpha-Untereinheit trägt den Mo-*bis*MGD-Kofaktor und ein Eisen-Schwefel-Zentrum, während die Beta-Untereinheit vier weitere Eisen-Schwefel-Zentren und die Gamma-Untereinheit ein Häm *b* enthält (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2001; Szaleniec *et al.*, 2003).

In einer aeroben Umgebung ist das gereinigte Enzym instabil und verliert seine Aktivität innerhalb von wenigen Minuten. Diese Inaktivierung durch Luftsauerstoff kann jedoch durch Zugabe von künstlichen Elektronenakzeptoren, die ein Redoxpotential um + 400 mV besitzen, verhindert werden (Kniemeyer *et al.* 2001a; Szaleniec *et al.*, 2003; Jobst, 2005). Vermutlich wird dadurch der Häm *b*-Kofaktor des Enzyms im oxidierten Zustand gehalten, so dass eine Generierung von radikalischen, reaktiven Sauerstoffspezies verhindert wird.

6. Anaerober Abbau von Ethylbenzol

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist das initiale Schlüsselenzym im anaeroben Abbau von Ethylbenzol (Abbildung 4). Diese anaerobe Ethylbenzol-Mineralisierung wurde in drei Denitrifizierern der Gattung *Aromatoleum* (Stämme EbN1, PbN1 und EB1) beobachtet (Rabus *et al.*, 1995; Ball *et al.*, 1996), welche zur β -Untergruppe der Proteobakterien gehören. Der einleitende Schritt dieses Abbaupfades besteht aus einer Sauerstoff-unabhängigen Oxidation der Methylengruppe des Ethyl-benzols zu (*S*)-1-Phenylethanol, welche im Periplasma stattfindet (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Im Cytoplasma wird dieser Alkohol anschließend durch eine (*S*)-1-Phenylethanol Dehydrogenase zu Acetophenon weiter oxidiert (Kniemeyer *et al.* 2001 b), welches weiter zu Benzoylacetat carboxyliert wird (Rabus *et al.*, 1995; Ball *et al.*, 1996, Jobst, 2005).

Benzoylacetat wird daraufhin vermutlich durch eine AMP-produzierende Ligase zu Benzoylacetyl-CoA aktiviert. Das Gen (*bal*), welches vermutlich für diese Ligase kodiert, wurde zusammen mit den Genen der Acetophenon-Carboxylase (*apcA-E*) auf einem Operon entdeckt (Rabus *et al.*, 2002; Abbildung 5).

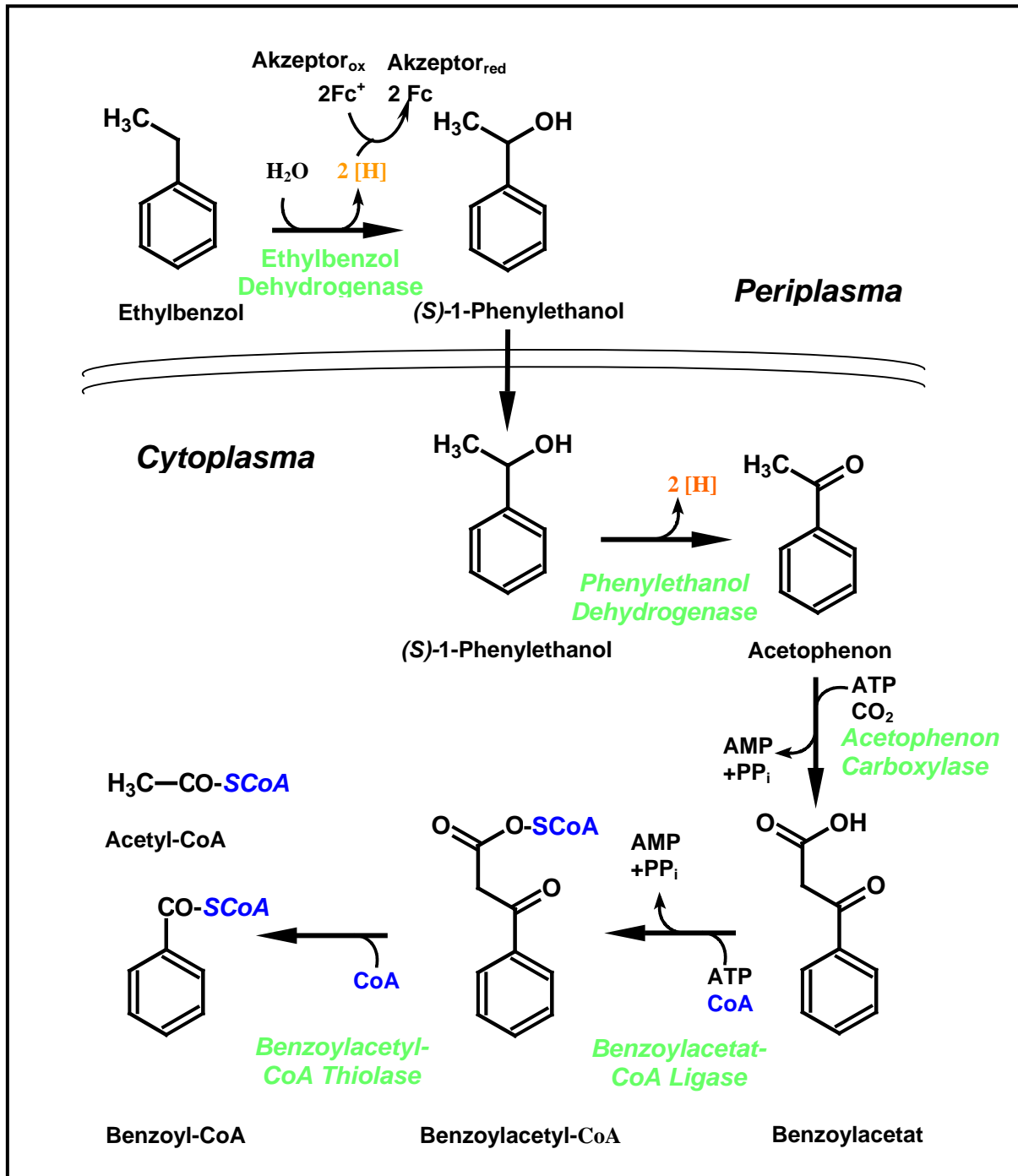


Abbildung 4: Postulierter anaerober Abbau von Ethylbenzol durch *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1. Fc^+ , Ferrizinium, Fc , Ferrozen

Im nachfolgenden Schritt wird Benzoylacetyl-CoA durch eine Thiolase zu Benzoyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten. Benzoyl-CoA ist eines der zentralen Intermediate des anaeroben

Aromaten-Stoffwechsels und Substrat des Schlüsselenzyms des anaeroben Aromatenabbaus, der Benzoyl-CoA Reduktase. Der aromatische Ring von Benzoyl-CoA wird dabei durch eine ATP-abhängige Zwei-Elektronen-Reduktion zu einem zyklischen Dien umgesetzt (Boll *et al.*, 1995). Das de-aromatisierte Produkt wird anschließend über Hydratisierungs- und Oxidationsschritte für eine hydrolytische Ringöffnung vorbereitet (Laempe *et al.*, 1999). Abschließend werden die offenkettigen Intermediate über β -Oxidation zu Acetyl-CoA-Einheiten und CO₂ umgesetzt.

Vor kurzem wurde auch ein marines, sulfatreduzierendes Bakterium aus dem Sediment des Guaymas Basin (Golf von Kalifornien) isoliert, das Ethylbenzol abbaut (Kniemeyer *et al.* 2003). Jedoch verläuft dieser Abbauweg im Gegensatz zu jenem in denitrifizierenden Bakterien analog zum Toluol-Abbau (Leutwein *et al.*, 1999) über eine radikalische Addition von Fumarat. Der Abbauweg des Ethylbenzols über Hydroxylierung zu (S)-1-Phenylethanol scheint also spezifisch für denitrifizierende Bakterien zu sein.

7. Die Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase

Die drei Gene der Ethylbenzol- Dehydrogenase (*ebdABC*) wurden durch N-terminale Sequenzierung eindeutig zu den Untereinheiten des Enzyms zugeordnet. Ein viertes Gen (*ebdD*), welches sich auf dem selben Operon befindet, kodiert möglicherweise für ein Enzym-spezifisches Chaperon, welches am Molybdän-Kofaktor-Einbau in die Alpha-Untereinheit beteiligt ist (Rabus *et al.*, 2002). Gemeinsam mit dem Gen der (S)-1- Phenylethanol Dehydrogenase (*ped*) bilden diese ein Operon (Abbildung 5). Die weiteren Enzyme des Ethylbenzol-Abbauwegs werden durch ein zweites Operon (*apc-bal*-Operon, Abbildung 5) codiert. Zwischen den beiden Operons befinden sich Gene für regulatorische Proteine, die vermutlich an der Ethylbenzol- bzw. Acetophenon-abhängigen Regulation der Genexpression beteiligt sind (Rabus *et al.*, 2002). Interessanterweise besitzt das Chromosom von EbN1 eine zweite Version von *ebd*- und *ped*-ähnlichen Genen, wobei die Genanordnung dieser Paraloge revers ist und die Sequenzähnlichkeiten zwischen 47,2 bis 83,5 % betragen (Rabus *et al.*, 2005).

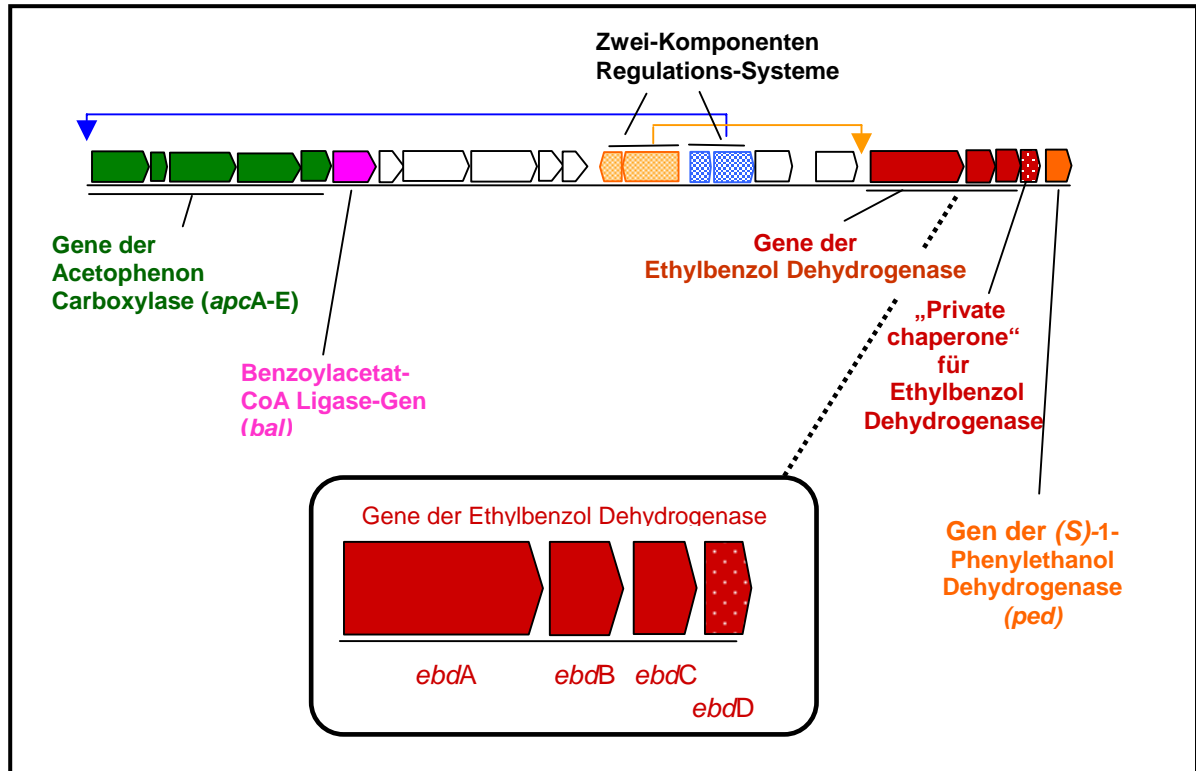


Abbildung 5: Organisation der Gene des anaeroben Ethylbenzol-Abbaus in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1.

8. Zielsetzung der Arbeit

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist ein Schlüsselenzym des anaeroben Ethylbenzol Abbauweges. Bisher wurde die Biochemie des Enzyms im denitrifizierenden Bakterium *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 studiert. Das Enzym katalysiert eine bisher einzigartige Redoxreaktion, die Sauerstoff-unabhängige und stereospezifische Oxidation eines aromatischen Kohlenwasserstoffes. Um die Struktur/Funktionsbeziehung dieses Enzyms genauer zu verstehen, sollte das Enzym unter anaeroben Bedingungen kristallisiert werden. Nach der erfolgreichen Kristallisation sollte die Struktur des Enzyms durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Um die bisher einzigartige Reaktion des Enzyms zu untersuchen und ihren Mechanismus aufzuklären, wurden mögliche alternative Substrate Verbindungen auf Umsetzung oder Inhibition des Enzyms getestet. Mit einigen bereits bekannten und neu identifizierten Inhibitoren wurden ausführliche Kinetikstudien durchgeführt. Durch die Aufklärung des Inhibitionstyps und der Inhibitorkonstanten einiger Inhibitoren der Ethylbenzol Dehydrogenase sollten weitere Indizien zum Mechanismus des Enzyms erhalten und Grundlagen für weitergehende Studien gelegt werden. Mittels UV-Vis- und Elektronenspinresonanz (ESR-)Spektroskopie wurden die Kofaktoren des Enzyms unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen und auch bei Anwesenheit einiger Inhibitoren studiert und charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war die Bestimmung derer Redoxpotentiale der intramolekularen Redox-Zentren.

Um die Ethylbenzol Dehydrogenase für spätere Mutationsstudien rekombinant produzieren zu können, wurde ein Vektor für die Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase konstruiert, mit welchem man das rekombinante Protein nicht nur in *Escherichia coli* produzieren kann, sondern auch in anderen Gram-negativen Bakterien, wie z.B. der Gattung *Aromatoleum*.

Bereits in früheren Arbeiten wurde versucht, die Benzoylacetat-CoA Ligase aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 zu reinigen. Doch die Reinigung des Proteins war aufgrund von dessen Instabilität und Kontamination mit Benzoat-CoA Ligase nicht gelungen. Deshalb sollte das Enzym rekombinant mit einem His-Tag in *Escherichia coli* überproduziert werden, um das Protein für dessen spätere Charakterisierung einfach reinigen zu können.

MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Materialien

1.1. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> XL1- blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17, supE44, relA1, lac ⁻ , [F ⁺ pro AB Lac ^q ZΔM15, Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str ^r), endA1, nupG	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> S17-1	hsdR17, endA, pro, recA, Nx ^S , integriertes RP4-2 (Tc::Mu, Km::Tn7), Mobilisatorstamm	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Aromatoleum aromaticum</i> Stamm EbN1	Wildtyp	Rabus <i>et al.</i> , 1995

1.2. Verwendete Plasmide und Oligonukleotide

Die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide sind in Tabelle 2 und 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz
pTrc99a	Amann <i>et al.</i> , 1988
pBBR1-MCS4	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBAD/102 D-TOPO [®] ThioFusion [™] Expression Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
pBAD/D-TOPO+ <i>bal</i>	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide. Eingeführte Schnittstellen sind unterstrichen.

Orientierung	Bezeichnung	Sequenz
→ 5'-Primer	pBadTOPO_bcl_for	5'-CACCCAAGGAGAAGTCATGTTGAATGAAC TCG - 3'
→ 3'-Primer	pBadTOPO_bcl_rev	5'-ACTGCTGCCTCGCACCGCGAGGAGCGAGTT - 3'
→ 5'-Primer	pTrcBsrG1_LacI_for	5'-GCGCTGTACAGACACCATCGAATGGTGCAA AACC-3'
→ 3'-Primer	pTrc_XhoI_NdeI_rev	5'-GCGCCTCGAG CATATG CTGTTTCCTGTGTGA AAT-3'
→ 3'-Primer	pTrc_BglIII_T1/2_rev	5'-GCGCAGATCTAAGAGTTTGTAGAAACGCAAA AAGG --3'

1.3. Biochemikalien

Coenzym A stammte von der Firma Gerbu (Gaiberg). Die übrigen Biochemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), GE Healthcare/Amersham Biosciences (Freiburg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsendonukleasen stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande).

1.4. Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, in der größtmöglichen Reinheit von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Alpha Aesar (Karlsruhe) bezogen. Bacto-Agar und Hefeextrakt stammen von der Firma Difco (Detroit, USA).

1.5. Gase

Stickstoff (99,99 %), NO (99,8 %) und Formiergas (5 % Wasserstoff, 95 % Stickstoff) wurden von den Sauerstoffwerken Friedrichshafen bezogen.

1.6. Chromatographiematerial

Material und Ausrüstung für die Proteinreinigung wurden von der Firma GE Healthcare/ Amersham-Bioscience (Freiburg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und BioRad (München) bezogen.

1.7. Material für Klonierung und Expression

Materialien für molekularbiologische Experimente wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Böhlinger (Mannheim), Peqlab Biotechnologie (Erlangen), Invitrogen (Karlsruhe), Biomers (Ulm) bezogen.

2. Biochemische Methoden

2.1. Züchtung von Bakterien und Herstellung von Zellextrakten

2.1.1. Anzucht von *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN-1 auf Ethylbenzol

Die Anzucht wurde anaerob unter denitrifizierenden Bedingungen in Mineralsalzmedium bei 30 °C durchgeführt. Dazu wurde das Grundmedium mit den 1000-fach konzentriert angesetzten Vitamin- und Spurenelement-Stammlösungen komplettiert. Als Trägerphase für Ethylbenzol wurde das Medium mit 2 % (v/v) Paraffinöl überschichtet. Ethylbenzol (2 % v/v bezogen auf das Paraffinöl) und NaHCO₃ (40 mM) wurden als einzige Kohlenstoffquellen zugesetzt. Nitrat wurde im Grund-medium mit einer Anfangskonzentration von 10 mM als Elektronenakzeptor zugegeben. Die Anzucht der Fermenter-Vorkulturen erfolgte anaerob in 1-l-Kulturflaschen (Müller & Kempel, Bülach, Schweiz). Zur Kontrolle des Nitrat/Nitrit-Gehalts wurden Teststäbchen (Mercoquant Nitrat-Test, Merck, Darmstadt) verwendet. Sobald im Medium kein Nitrat und Nitrit mehr nachweisbar war, wurde mit jeweils 10 mM Nitrat und 40 µl Ethylbenzol nachgefüttert. Größere Zellmengen wurden in einem 200-l-Fermenter (Firma Bioengineering, Wald, Schweiz) angezogen. Hierfür wurde das Grundmedium im Fermenter angesetzt, autoklaviert und anschließend mit den getrennt angesetzten, sterilen Stammlösungen komplettiert. Als Inokulum dienten 2 Liter einer logarithmisch wachsenden Vorkultur. Das Wachstum wurde über Messung der optischen Dichte (OD_{578nm}) verfolgt. Da das gelöste Paraffinöl zu einer erhöhten optischen Dichte führt, wurden für die OD-Bestimmung 10 ml der Fermenter-Kultur zuerst abzentrifugiert (10 min bei 4 °C und 5000 Upm, Hettich EBA 8S). Das Zellpellet wurde anschließend mit der gleichen Menge an Grundpuffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend für die OD-Bestimmung verwendet. Bei einer OD₅₇₈ Zunahme von 0,4 wurden diskontinuierlich 80 ml Ethylbenzol nachgefüttert. Nitrat wurde kontinuierlich mit einer Rate zugepumpt, die ein exponentielles Wachstum der Zellen mit einer Generationszeit von 16-30 h ermöglichte. Bei einer OD₅₇₈ ~ 2 wurden je 100 ml einer Spurenelement-, Vitamin-, Calcium- und Magnesium-Stammlösung zugefüttert, um einer möglichen Limitierung vorzubeugen. Die Ernte der Zellen wurde bei 16 °C in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₅₇₈ von ca. 3,0 mittels einer Durchlaufzentrifuge (CE-PA, TypZ41-101; Lahr) durchgeführt. Unmittelbar nach

der Zentrifugation wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Für die Herstellung des folgenden Mediums und der erforderlichen Supplemente wurde deionisiertes Wasser verwendet. Kulturmedien und Puffer wurden durch Autoklavieren (120 °C, 20 min), hitzelabile Lösungen durch Filtration mit Sterilfiltern (0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) sterilisiert. Die Medien und Stammlösungen wurden vor dem Autoklavieren anaerobisiert, indem sie wiederholt mit 99,99 % Stickstoff begast und anschließend unter Vakuum entgast wurden. Die Zyklen dauerten je 3 min, wobei 10 bis 15 Zyklen durchgeführt wurden.

Tabelle 4: Grundmedium für die Anzucht von *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1

	Endkonzentration im Medium [mM]	Einwaage [g/l]
KH ₂ PO ₄	3,7	0,50
NH ₄ Cl	5,6	0,30
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0	0,50
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,7	0,10
NaNO ₃	10	0,85

Das Medium wurde in 100 ml oder 1 l-Portionen anaerobisiert und autoklaviert. Anschließend wurden folgende Komponenten zugesetzt:

Tabelle 5: Spurenelement Lösung

Spurenelementlösung II (1000-fach) (Rabus, 1995)

	Einwaage
Na ₂ -EDTA	5200 mg/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2100 mg/l
H ₃ BO ₃	30 mg/l
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg/l
NiCl ₂ x 6H ₂ O	24 mg/l
CuCl ₂ x 2H ₂ O	29 mg/l
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	144 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg/l

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt.

Tabelle 6: Vitamin Lösung

Vitaminlösung VL-7 (1000-fach) (Pfennig, 1978)

	Einwaage
Cyanocobalamin	100 mg/l
Pyridoxamindihydrochlorid	300 mg/l
Thiamindichlorid	20 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	100 mg/l
4-Aminobenzoessäure	80 mg/l
D(+)-Biotin	20 mg/l
Nicotinsäure	200 mg/l

Tabelle 7: Selenit-Wolframat-Lösung.

Selenit-Wolframat-Lösung	
	Einwaage
NaOH	400 mg/l
Na ₂ SeO ₃	4 mg/l
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	8 mg/l

Tabelle 8: NaHCO₃ Stammlösung.

NaHCO₃ Stammlösung (1 M)	
	Einwaage
NaHCO ₃	84 g/l

Tabelle 9: Ascorbat Stammlösung.

Ascorbat Stammlösung (1 M)	
	Einwaage
Ascorbinsäure	11,6 g/100 ml

Die Ascorbinsäure wurde im Eisbad mit 2 M NaOH neutralisiert.

Tabelle 10: NaNO₃ Stammlösung.

NaNO₃ Stammlösung (1 M)	
	Einwaage
NaNO ₃	85 g/l

Tabelle 11: CaCl₂ Stammlösung.

CaCl₂ Stammlösung	
	Einwaage
CaCl ₂	0,5 g/l

Tabelle 12: MgCl₂ Stammlösung.

MgCl₂ Stammlösung	
	Einwaage
MgCl ₂	0,1 g/l

Dem autoklavierten und abgekühlten Medium wurden folgende Zusätze aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Tabelle 13: Supplemente für das Grundmedium.

	Zugegebene Menge
Spurenelementlösung II	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitaminlösung VL-7	1 ml/l
NaHCO ₃ Lösung	40 ml/l
Ascorbat Lösung	4 ml/l

Der pH-Wert wurde mit 2 M HCl auf pH=7,2 eingestellt (0,2 ml/100 ml bzw. 2 ml/l).

2.1.2. Anzucht von *Escherichia coli*

Kulturen. Die *E. coli* Flüssigkulturen wurden aerob bei 37°C oder 20 °C in Luria-Bertani (LB)-Medium (Miller, 1972) in zu 10-20% (v/v) gefüllten Erlenmeyerkolben oder in Reagenzgläsern angezogen.

Medium : (Sambrook *et al.*, 1989)

LB (Luria-Bertani)-Medium (Miller, 1972):

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) NaCl

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

Supplement und Antibiotika wurde nach Bedarf zugesetzt.

Ampicillin (100 mg/ml H ₂ O)	100 µg/ml
---	-----------

Arabinose (20 % in H ₂ O)	0,2 %
--------------------------------------	-------

Die Ampicillin- und Arabinose-Stammlösungen (100-fach konzentriert) wurden sterilfiltriert. Für die Anzucht auf LB-Agar wurden 1,4 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die LB-Agar Platten wurden in Brutschränken (Heraeus Instruments, Stuttgart) bei 37°C über Nacht bebrütet. Die Kulturen wurden in Kolben unter Schütteln (160- 200 U/min) inkubiert oder mit 200 – 300 U/min gerührt.

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Zunahme der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt (Pharmacia Biotech; Ultraspec 3000), wobei als Nullwert unbeimpftes Medium verwendet wurde. Bei OD- Werten $\geq 0,5$ wurden die Proben mit entsprechendem Medium verdünnt, da nur im Extinktionsbereich von 0 bis 0,5 Linearität zwischen Bakterienzahl/ml und OD gegeben ist.

2.2. Stammkulturhaltung

***Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1.** Zur Herstellung von Stammkulturen von *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden Kultur in sterilen Hungate-Röhrchen für 10 min bei 4 °C und 5000 Upm (Hettich EBA 8S) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 1 ml komplettiertem Grundmedium mit 5 % (v/v) sterilem DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in sterile 2-ml-Kryoröhrchen (Nalagene, Wiesbaden) überführt und bei -70 °C eingefroren.

Escherichia coli. *Escherichia coli*-Einzelkolonien wurden auf LB/Antibiotika Platten dicht ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Kolonien wurden dann in 2

ml LB-Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nalagene, Wiesbaden) überführt, mit 5% (v/v) sterilem DMSO vermischt und sofort bei -70°C eingefroren.

2.3. Herstellung von Zellextrakten

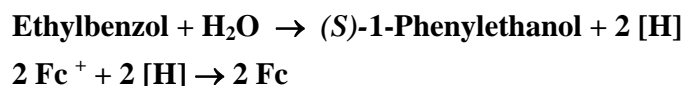
Zellaufschluss mit French Press. Die Zellextrakte wurden aerob hergestellt. Frisch geerntete oder gefrorene Zellen wurden in einem Volumen (v/v) H_2O demin. (*Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1) oder in 10 mM Tris/ HCl pH 7,5 (*E. coli*) mit $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ DNaseI aufgenommen und im Eisbad resuspendiert. Die Zellen wurden durch zweimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (American Instruments Company, Maryland, USA) bei einem Druck von 137 MPa aufgeschlossen. Das Lysat wurde 60 min bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge L-60, 70 Ti-Festwinkelrotor, München), wodurch die Membranfraktion zusammen mit nicht aufgeschlossenen Zellen sedimentieren, während die löslichen Proteine im Überstand bleiben. Der Überstand (Extrakt) wurde sofort weiterverwendet oder mit 10% Glycerin (v/v) versehen und bei -70°C gelagert.

Zellaufschluss mit der Zelmühle. Der Zellaufschluss mit der Zelmühle (MM 200, Retsch; Haan, Deutschland) dient zum Aufschließen kleinerer Zellmengen ($< 0,5 \text{ g}$ Feuchtzellmasse). Dazu wurde 0,6 ml eiskalte Zellsuspension mit 1,2 g Glaskügelchen (Durchmesser 0,1- 0,25 mm) für 6 min bei 30 Hz geschüttelt. Der Zellaufschluss wurde 15 min bei 20 800 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Um das Pellet für Einschlusskörperchen-Untersuchungen weiterverwenden zu können, wurde es mit 2 mM Tris HCl pH 7,5 resuspendiert und durch Gaze filtriert, so dass die Glaskügelchen entfernt wurden. Das Pellet wurde danach für 10 min bei 20800 x g nochmals abzentrifugiert.

2.4. Enzymatische Tests

2.4.1. Enzymtest zur Bestimmung der Ethylbenzol Dehydrogenase Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität wurde in einem photometrischen Enzymtest bei 55°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Folgende Reaktionen wurden gemessen:



Dabei wurde die Reduktion von Ferrizinium-Tetrafluorborat (Fc^+) als künstlichen Elektronenakzeptor bei 290 nm ($\Delta\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) verfolgt. Der Standard-Testansatz enthielt folgende Komponenten:

Tabelle 14: Standard-Testansatz

Komponenten	Volumen
Testpuffer: 100 mM TrisHCl pH 8,0 200 μ M Ferrizinium Tetrafluorborat	500 μ l
Ethylbenzol	10 μ l
gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase (Endkonzentration im Test: 2–40 μ g ml ⁻¹)	1-10 μ l

Die Reaktion wurde mit einer 50 mM Ethylbenzol Stammlösung in tert-Butanol (Endkonzentration im Test: 1 mM) oder alternativ mit einer gesättigten wässrigen Ethylbenzol-Lösung (1 mM Ethylbenzol) (Endkonzentration im Test 0,1 mM) gestartet. Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden die Temperatur zwischen 30 °C und 85 °C variiert.

2.4.2. Enzymtest zur Bestimmung der Benzoylacetat-CoA Ligase Aktivität

Die Aktivierung der aromatischen Säure Benzoylacetat zu ihrem korrespondierenden CoA-Thioester durch CoA- Ligase wurde aerob durch einen gekoppelten, spektroskopischen Test durchgeführt. Die Bildung von AMP bei 30 °C wurde durch Zusatz von Myokinase, Pyruvatkinase, Phosphoenolpyruvat und Lactat-Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt (Ziegler *et al.*, 1987). Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm spektrophotometrisch verfolgt ($\epsilon_{365/\text{NADH}} = 3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ein Schema über den Reaktionsverlauf ist in Abbildung 6 dargestellt.

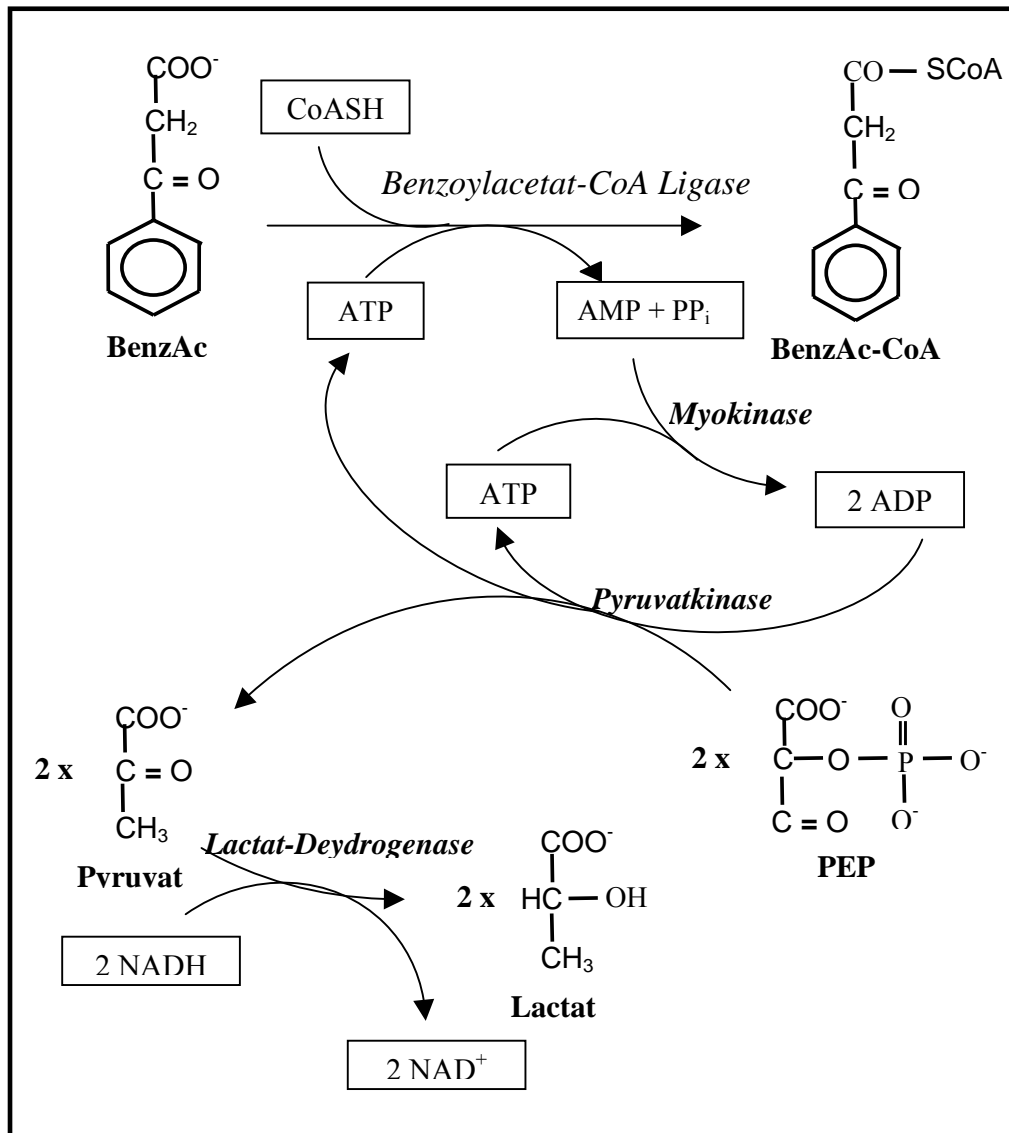


Abbildung 6: Gekoppelter, photometrischer Aktivitätstest für die Benzoylacetat-CoA Ligase. BenzAc (Benzoylacetat); BenzAc-CoA (Benzoylacetyl-CoA); PEP (Phosphoenolpyruvat)

2.5. Reinigung der Ethylbenzol Dehydrogenase

Die Ethylbenzol Dehydrogenase wurde ausgehend von 40 g gezogenen Zellen (Feuchtzellmasse) unter aeroben Bedingungen gereinigt. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zellextrakte wurden durch Lyse von geernteten Zellen mit der „French-Press“-Zelle und anschließende Zentrifugation (100000 g, 4 °C, 60 min) hergestellt.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose. Zellextrakt (50 ml, 3000 mg Protein) wurde in zwei Portionen auf eine DEAE-Sepharose Fast Flow-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg; 50 ml, Innendurchmesser 26 mm) aufgetragen, die mit 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerin, 100 µM Ferrizinium Tetrafluorborat (Grundpuffer 1) bei einer Flussrate von 5 ml

min⁻¹ äquiliibriert worden war. Die beladene Säule wurde mit 3 Säulenvolumen Grundpuffer (150 ml) gewaschen. Die Ethylbenzol Dehydrogenase eluierte unter diesen Bedingungen im Durchlauf der Säule. Der Durchlauf wurde für 1 h bei 4 °C und 100000 g abzentrifugiert, um Membranen und andere Verunreinigungen zu entfernen.

Chromatographie an Hydroxyapatit. Der klare 100000 g Überstand (200 ml, 1200 mg Protein) wurde in Aliquots aufgeteilt und auf eine Hydroxyapatit-Säule (Macro-Prep ceramic hydroxyapatite; Bio-Rad, München, 50 ml, Innendurchmesser 26 mm) aufgetragen, die mit 10 mM Tris-Acetat pH 8,0, 10 % Glycerin (v/v), 100 µM Ferrizinium Tetrafluorborat (Grundpuffer 2) bei einer Flussrate von 5 ml min⁻¹ äquiliibriert worden war. Fraktionen von 10 ml wurden gesammelt. Die beladene Säule wurde mit 150 ml Puffer B gewaschen. Die Säule wurde über einen linearen Gradienten von 0 bis 300 mM Kaliumphosphat im Grundpuffer über 10 Säulenvolumen eluiert. Die Ethylbenzol Dehydrogenase eluierte zwischen 160 mM und 200 mM Kalium-Phosphat in einem Volumen von 63 ml (ca. 55 mg Protein). Anschließend wurde die gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase durch Ultrafiltration (Millipore Amicon Ultra, Ausschlussgröße 50 kDa, Millipore, USA) ankonzentriert und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.6. Fällungen

2.6.1. Ammoniumsulfat-Fällung

Rekombinante Benzoylacetat-CoA Ligase wurde mit einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung pH 8,0 gefällt, die 1 mM EDTA enthält. Die gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung wurde über einen Zeitraum von 30 min tropfenweise unter leichtem Rühren im Eisbad zur Proteinfraction zugesetzt, bis eine Sättigung von 33 % erreicht war. Danach wurde 15 Minuten weitergerührt und das ausgefällte Protein anschließend für 15 min bei 10 000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach der 33 % Fällung weiterverwendet, wie oben beschrieben auf 60 % Sättigung eingestellt und abzentrifugiert. Der Überstand der 60 % Ammoniumsulfat-Fällung wurde in 10 mM TrisHCl, pH 8,0 weiterverwendet und über Nacht in Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) dialysiert.

2.6.2. Trichloressigsäurefällung

Proben mit geringem Proteingehalt wurden vor dem Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel mit Trichloressigsäure gefällt. Dazu wurden 150 µl Proteinlösung mit 50 µl 24 % Trichloressigsäure (w/v) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 20 800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 µl SDS- Probenpuffer und 10 µl 0,1 M NaOH

aufgenommen und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt.

2.7. Elektrophoretische Methoden

2.7.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) dienen zur Auftrennung von Proteinen nach ihren apparenten Molekülmassen. Es wurden 10 %-ige oder 12,5 %-ige Trenngele und 6 %-ige Sammelgele verwendet.

Probenvorbereitung. Die Proteinproben wurden mit 1 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Der Probenpuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 15: Zusammensetzung des Probenpuffers

Probenpuffer	2 % (w/v) SDS
	0,25 mM Dithioerythritol
	0,2 M Tris/HCl, pH 6,8
	72 % (w/v) Glycerin
	0,01 % Bromphenolblau

Pro Geltasche wurden 5- 20 µg Protein in 10- 20 µl Probenvolumen aufgetragen. Zur Abschätzung der Molekülmassen wurde zusätzlich ein Gemisch aus folgenden Standardproteinen aufgetragen:

Tabelle 16: Zusammensetzung des Standardprotein-Gemisches.

Phosphorylase B	94 kDa
Rinderserumalbumin	67 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Lactat Dehydrogenase	34 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Lysozym	14 kDa

Jede Bande enthielt 2 µg Protein. Der Molekülmassenstandard wurde auf dieselbe Weise wie die Proben behandelt.

Trichloressigsäure-Fällung. Proben mit geringem Proteingehalt wurden vor dem Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel mit Trichloressigsäure gefällt (siehe Material und Methoden 2.6.2.).

Gel-Zusammensetzung. Die Trenn- und Sammelgele waren folgendermaßen zusammengesetzt (Tabelle 17 und 18):

Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenngels:

10 – 12,5 %	Acrylamid/Bisacrylamid–Stammlösung (30 %/ 0,8 %; v/v) (Roth, Karlsruhe)
450 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
0,001 % (v/v)	TEMED

Tabelle 18: Zusammensetzung des Sammelgels:

6 %	Acrylamid/Bisacrylamid–Stammlösung (30 %/ 0,8 %; v/v) (Roth, Karlsruhe)
125 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,1 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
0,001 % (v/v)	TEMED

Gelherstellung. Hierzu wurden zwei fett- und staubfreie Glasplatten (Minigele 6,5 cm x 9,5 cm) mit Abstandshaltern (0,1 cm) zusammengesetzt und mit 1 %-iger (w/v) Agarose-Lösung abgedichtet. Dann wurde zunächst die Trenngel-Lösung bis zu etwa 3/4 der Kammerhöhe gegossen. Die Oberfläche wurde mit Wasser-gesättigtem Isopropanol überschichtet. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels wurde zwischen 10 % und 12,5 % variiert. Nachdem das Gel polymerisiert war (30 min), wurde die Geloberfläche mit H₂O gespült. Die Kammer wurde mit Sammelgel-Lösung aufgefüllt, und der Taschenformer wurde eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Taschenformer entfernt. Das maximale Auftragsvolumen betrug 20-30 µl Probe pro Tasche für Minigele.

Laufbedingungen. Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Solange die Proben im Sammelgel waren, wurden 90 V Spannung angelegt, mit den Proben im Trenngel dann 140 V. Der Laufpuffer enthielt 24,8 mM Tris, 192 mM Glycin und 3,5 mM SDS. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Trenngels erreichte.

Färbung von Polyacrylamidgelen:

Coomassie-Färbung. Die Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie wurde modifiziert nach Zehr *et al.* (1989) durchgeführt. Bei allen Schritten wurden die Gele bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Gele wurden direkt nach dem Lauf über Nacht in 0,25 % (w/v) Coomassie Blue R 250, 30 % (v/v) Methanol gefärbt. Anschließend wurden die Gele 30 min in Entfärber I (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) und 1 h in Entfärber II (10 % (v/v) Essigsäure) entfärbt. Die Gele wurden danach in einem Geltrockner (LBK Amersham-Pharmacia, Freiburg) zwischen zwei Cellophan-Folien getrocknet.

Silberfärbung. Die Färbung wurde nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1988) durchgeführt. Bei allen Schritten wurde das Gel bei Raumtemperatur geschwenkt. Alle bei der Färbung verwendeten Lösungen sind in Tabelle 19 aufgeführt. Zuerst wurde das Gel für 30 Minuten bis mehrere Stunden in Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde das Geld direkt aus der Fixierlösung in Inkubationslösung übertragen, in welcher es wiederum zwischen 30 Minuten und mehrere Stunden inkubiert wurde. Danach wurde es drei Mal mit destilliertem Wasser für ca. 15 Minuten gewaschen und anschließend für 15 bis 30 Minuten in Silbernitratlösung gegeben. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurde es aus dem Wasser entnommen, wobei das Wasser gut abtropfen sollte. Dann wurde das Gel im Entwickler inkubiert bis die gewünschte Färbung eintrat. Anschließend wurde wiederum kurz mit destilliertem Wasser nachgespült und das Gel sofort in Stopplösung übertragen. Darin wurde es ca. 25 Minuten bewegt. Zum Schluss wurde das Gel nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen und für 25 Minuten in Trockenlösung inkubiert.

Tabelle 19: Lösung für die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988)

Fixierlösung:	30 % Ethanol 10 % Essigsäure	
Inkubationslösung:	30 % Ethanol 0,5 M Natrium-Acetat 0,5 % Glutaraldehyd 0,2 % Natrium-Thiosulfat	<i>kurz vor der Verwendung</i> <i>kurz vor der Verwendung</i>
Silbernitratlösung:	0,1 % Silbernitrat 0,02 % Formaldehyd	<i>kurz vor der Verwendung</i>
Entwickler:	2,5 % Natrium-Carbonat 0,01 % Formaldehyd	<i>kurz vor der Verwendung</i>
Stopplösung:	50 mM EDTA	
Trocknungslösung:	10 % Glycerin 10 % Ethanol	

2.7.2. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in horizontalen Agarose-Gelen (6,5 x 10 x 0,5 cm³) nach Größe und Konformation aufgetrennt. Folgendes Material wurde verwendet (Tabelle 20).

Tabelle 20: Material für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.

50 x TAE Puffer	2 M Tris- Acetat (242 g Tris, 57 ml Acetat), pH 8 0,05 M EDTA ad 1 l Aqua dest.
Ladepuffer 6 x	6 ml Glycerin 1,2 ml 50 x TAE- Puffer Spatelspitze Bromphenolblau
Laufpuffer	1 x TAE
Ethidiumbromid	Stammlösung (10 mg/ml; Roth, Karlsruhe)
Längenstandard	GeneRuler™ 1 kb Ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-1 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer eingesetzt. Die Agarose wurde durch Kochen gelöst, dann wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen, und ein Taschenformer wurde eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde der Taschenformer entfernt, und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Auftragepuffer versetzt und aufgetragen. Als Längenstandard und zur Abschätzung der DNA-Menge wurde die GeneRuler™ 1 kbp-DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon Rot) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 120 V in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden mit UV-Licht bei 312 nm auf einer UV-Durchlichtlampe detektiert (IL 200M, Bachofer, Reutlingen).

2.8. Protein-Konzentrationsbestimmung

2.8.1. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Als Standard diente Albumin aus Rinderserum (BSA).

2.8.2. Spektroskopische Methode nach Granum und Whitaker

Um Proteinkonzentrationen bei kleineren Versuchsansätzen abzuschätzen, wurde die spektroskopische Methode nach Granum und Whitaker (1980) eingesetzt. Hierbei wurde die Absorption der proteinhaltigen Proben bei 235 nm und bei 280 nm (A_{235} und A_{280}) in einem Spektrophotometer (Lambda 2S, Perkin Elmer, Überlingen) bestimmt. Für die Berechnung der Proteinkonzentration gilt: Proteinkonzentration (mg/ml) = $(A_{235} - A_{280}) \cdot (2,51)^{-1}$.

2.9. Protein-Kristallisation

Die Kristallisation wurde unter anaeroben Bedingungen unter Stickstoff/Wasserstoff-Atmosphäre (95 % N₂, 5 % H₂ (v/v)) in einem Anaerobenzelt und 293 K durchgeführt. Für die ersten Kristallisationsexperimente wurde der Jena Bioscience Crystal Screen (Jena, Deutschland) verwendet.

2.9.1. Probenvorbereitung

Die aerob gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase wurde sofort nach dem letzten Chromatographie-schritt durch Ultrafiltration mit Hilfe einer Amicon Ultra Filtereinheit (Ausschlussgröße 50 kDa, Millipore, USA) durch Zentrifugation (4000 x g) auf die gewünschte Proteinkonzentration (ca. 21 mg/ml) ankonzentriert.

2.9.2. „Microbatch“-Technik

Die Kristallisationsplatte, die für diese Technik verwendet wurde, bestand aus 60 Vertiefungen („60 Well Mini Tray“-Platte, Nunc). Je ein Tropfen Proteinlösung (1-5 µl) wurde mit demselben Volumen Kristallisationspuffer vermischt und anschließend mit Silikonöl M50 überschichtet.

2.9.3. „Hanging-drop“-Technik

Die Kristallisationsplatte, die für diese Technik verwendet wurde, besteht aus 24 Vertiefungen und 18 mm runde Deckgläser (Q Plate II Polypropylene (Hampton Research, Laguna Niguel, USA). In jedes Reservoir der Kristallisationsplatte wurde 700 µl Kristallisationspuffer vorgelegt. Anschließend wurde ein Tropfen der Proteinlösung (2,5 µl) in der Mitte eines runden Deckgläschens platziert und mit demselben Volumen Kristallisationspuffer (2,5 µl) vermischt. Das Deckglas wurde mit einem Rand aus Silikonöl versehen und umgedreht auf dem Reservoir der Kristallisationsplatte gelegt.

2.9.3. „Sitting-drop“-Technik

Die Kristallisationsplatte, die für diese Technik verwendet wurde, besteht aus zwölf Reihen in die jeweils 8 Ansätze pipettiert werden können (Hampton Research, Laguna Niguel, USA). Jede der Reihen kann einzeln entnommen werden. Pro Ansatz wurde zuerst 100 µl Kristallisationspuffer in das Reservoir vorgelegt. Ein Tropfen, der 2,5 µl Protein enthielt, wurde mit demselben Volumen Reservoirpuffer (2,5 µl) gemischt und in die Vertiefung der Kristallisationsplatte pipettiert. Nachdem alle 8 Ansätze einer Reihe pipettiert waren, wurden sie sofort mit Tesafilm („kristallklar“) verschlossen, um das Verdunsten der Tropfen zu minimieren.

2.9.5. Auswertung der Kristallisationsansätze

Die Ansätze wurde sofort nach dem Verschließen unter dem Mikroskop (Zeiss, Jena, 100 x Vergrößerung) im Anaerobenzelt kontrolliert. Die Tropfen wurden in der ersten Woche jeden Tag und danach einmal pro Woche mikroskopiert.

2.9.6. Kristallisation der Ethylbenzol-Dehydrogenase

Für die ersten Kristallisationsexperimente mit der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde der Jena Bioscience Crystal Screen (Jena, Deutschland) benutzt, um die Ausgangsbedingungen für die Kristallisation des Proteins zu finden. Das Protein (21 mg/ml) wurde nach Ankonzentrierung so verwendet, wie es nach dem letzten Chromatographieschritt in 10 mM Tris-Acetat pH 8,0, 160 mM Kaliumphosphat, 10 % Glycerin, 100 μ M Ferrizinium Tetrafluorborat isoliert wurde (siehe Material und Methoden 2.5.). Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden die gefundenen Startbedingungen modifiziert, indem die PEG Konzentration, die Salzkonzentration, die Pufferkonzentration und der pH-Wert variiert wurde. Da die Ethylbenzol Dehydrogenase unter Sauerstoff-freier Atmosphäre kristallisiert wurde, wurden sämtliche Kristallisationspuffer vorher anaerobisiert. Auch die Kristallisationsplatten und die Pipettenspitzen wurden mindestens einen Tag vor dem Gebrauch unter anaerober Atmosphäre inkubiert, so dass man sicher sein konnte, dass der restliche, gelöste Sauerstoff aus dem Plastik ausdiffundiert war.

2.9.7. Einfrieren der Ethylbenzol Dehydrogenase Kristalle

Die Kristalle wurden direkt nach dem Ausschleusen aus dem Anaerobenzelt unter aerober Atmosphäre aus den Kristallisationsansätzen entnommen und sofort in flüssig Stickstoff eingefroren. Die Präzipitatkonzentration war aufgrund der trockenen Luftverhältnisse im Anaerobenzelt soweit angestiegen, um als Cryoschutz ausreichend zu sein.

2.9.8. Röntgenstrukturanalyse

Die Erfassung der Röntgenstrahl Daten und die Strukturaufklärung der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden von Daniel Kloer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G.E. Schulz, Institut für Organische Chemie und Biochemie; Freiburg) ausgeführt.

Erfassung der Röntgenstrahl Daten. Die gesamten Röntgenstrahl Daten wurden an der Swiss Light Source (Beam Line X06SA, Villigen, CH) aufgenommen. Die SAD-Datenreihe wurde an der Eisen K Kante aufgenommen, indem ein stark abgeschwächter Strahl verwendet wurde. Die K Kante wurde durch einen Röntgenstrahl Fluoreszenz Scan bestimmt. Die gesamten Beugungsintensitäten wurden mit XDS und XSCALE (Kabsch, 1993) verarbeitet und skaliert. Die anomalen Differenzen wurden mit XPREP (Bruker Nonius) gerechnet und die Positionen der Eisen-Schwefel Zentren und des Häm *b* Eisens wurden mit SHELXD (Schneider *et al.*, 2002) festgesetzt. Die einzelnen Eisenatome innerhalb der Zentren konnten jedoch nicht aufgelöst werden, so dass die fünf Eisen-Schwefel Zentren einzeln bearbeitet wurden. Folglich wurden die Proteinphasen mit MLPHARE (Otwinowski, 1991) nur bis zu einer Auflösung von 4,2 Å gerechnet. Dichte Modifikationen mit RESOLVE (Terwilliger, 2000) ergaben eine

interpretierbare Karte bei einer Auflösung von 4,2 Å. Indem die Positionen der Eisen-Schwefel Zentren verfolgt wurden, die durch das anomale Signal genau etabliert werden konnten, wurden sämtliche Polypeptid Kettensegmente der homologen Alpha- und Beta-Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase NarGHI von *Escherichia coli* (Bertero *et al.*, 2003) manuell in die Elektronendichte gelegt, indem COOT (Emsley *et al.*, 2004) verwendet wurde. Die modellierten Phasen dieses Teilmodells der Alpha- und Beta-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden durch RESOLVE mit den SAD Phasen kombiniert und in zahlreichen wiederholten Schritten zu einer Auflösung von 2,4 Å ausgebaut. Die daraus resultierende Elektronendichte Karte wurde manuell mit COOT verfolgt, wodurch sich ein zu 90 % vollständiges Modell ergeben hat. Bei den letzten Stadien der Phasenprozedur wurden die Phasen bis zu einer Auflösung von 1,8 Å erweitert, indem die hoch auflösenden Daten verwendet wurden und der Modellbau mit ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999) fortgesetzt wurde.

Verfeinerung der Struktur und Modellbau. Das Model wurde durch manuellen Wiederaufbau mit COOT und Verfeinerung mit REFMAC vervollständigt (Murshudov *et al.*, 1997). Die gesamten Kofaktoren waren in verschiedenen Fourier-Karten klar erkennbar und wurden in das Model integriert. Wassermoleküle wurden mit ARP/wARP platziert und manuell auf gute Stereochemie überprüft. Letztendlich wurde die Struktur mit einer TLS Gruppe für jede Untereinheit mit ihren Kofaktoren verfeinert. Den Entfernungen der Metall-Liganden am Mo Zentrum wurden keine Beschränkungen auferlegt. Um Produkt- und Substratkomplexe zu modellieren, wurden manuell Liganden mit COOT in die Tasche des aktiven Zentrums gelegt und danach wurde durch CNS (Brünger *et al.*, 1998) eine Energieminimierung durchgeführt. Die Koordinaten und Topologien der Kofaktoren und Liganden wurde durch PRODRG2 (Schüttelkopf *et al.*, 2004) entwickelt und eine Energieminimierung durchgeführt. Die Suche nach Strukturähnlichkeiten wurde mit DALI (Holm *et al.*, 1993) und Struktur-basierten Sequenzalignments mit T-COFFEE (Poirot *et al.*, 2004) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit POVscript+ (Fenn *et al.*, 2003) and POVRAY (www.povray.org) erzeugt.

2.10. Inhibitionskinetische Untersuchungen

2.10.1. Vorbereitung der Proben für Inaktivierungskinetiken

Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Stickstoffmonoxid (NO). Zuerst wurde aerob gereinigte und ankonzentrierte Ethylbenzol Dehydrogenase (26 µM) mit Stickstoff (99,99 % (v/v)) begast, um den restlichen gelösten Sauerstoff aus der Proteinlösung zu entfernen. Anschließend wurde das Enzym mit unterschiedlichen Konzentrationen an Stickstoffmonoxid bei 20 °C vorinkubiert. Die Konzentrationen des gasförmigen Inhibitors betrugen 0-63 % der Gasphase (v/v). Das entspricht Konzentrationen von 0-1,3 mM gelöstem NO in der wässrigen Phase.

Je nach Experiment betrug die Vorinkubationszeit 5-20 Minuten. Die einzelnen Ansätze wurden in anaeroben Glasgefäßen (2 ml), die mit gasdichten Gummistopfen verschlossen waren unter Stickstoff/ Wasserstoffatmosphäre (95:5 (v/v)) hergestellt.

Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Wasserstoffperoxid. Für die Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde das Enzym mit unterschiedlichen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (0-147 mM) für 5 Minuten auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurde das H_2O_2 -behandelte Enzym direkt in den photometrischen Aktivitätstest für die Ethylbenzol Dehydrogenase (Material und Methoden 2.4.1.) eingesetzt.

2.10.2. Aktivitätstest für Inhibitionskinetiken

Die Bestimmung der Aktivitäten der Ethylbenzol Dehydrogenase für die Inhibitionskinetiken wurde nach dem in Material und Methoden 2.4.1. beschriebenen Aktivitätstest für die Ethylbenzol Dehydrogenase unter aeroben Bedingungen bei 55 °C durchgeführt. Die Messungen wurden mit gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase (4 mg ml^{-1}) durchgeführt. Für die Aktivitätsmessungen wurde eine in tert-Butanol hergestellte Ethylbenzol Stammlösung (50 mM) verwendet. Auch die Inhibitoren wurden in tert-Butanol gelöst. Der Standard-Testansatz für die Inhibitionskinetiken der Ethylbenzol Dehydrogenase ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Standard-Testansatz für Inhibitionskinetik (525 µl Ansatz)

Komponenten	Volumen
Testpuffer: 100 mM TrisHCl pH 8,0 200 µM Ferrizinium Tetrafluorborat	500 µl
Inhibitor (Endkonzentration im Test: 1 µM-6500 µM)	10 µl
Substrat (Endkonzentration im Test: 47,7 µM-970 µM)	10 µl
gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase (Endkonzentration im Test: 8-40 µg/ml)	5 µl

In den Kontrollansätzen ohne Inhibitoren wurde der Volumenanteil des Inhibitors im Testansatz durch tert-Butanol ersetzt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten wurden jeweils Doppelwerte bestimmt. Die Konzentrationen des Substrats Ethylbenzol wurden zwischen 47,7 µM und 970 µM variiert, die Konzentrationen der Inhibitoren wurden zwischen 1 µM und 6500 µM variiert.

2.10.3. Auswertung der Inhibitionskinetikdaten

Die Darstellung der Sättigungskurven und Lineweaver-Burk-Plots wurde mit Hilfe eines Standard-Graphikprogramms (Prism 4.00, GraphPad, San Diego, Kanada) durchgeführt. Für die Berechnungen der kinetischen Inhibitionskonstanten wurde ein Programm zur Berechnung von Enzym-kinetischen Daten (Leonora, Steady-state Enzyme Kinetics on the IBM ® PC and Compatibles Version 1.0, Athel Cornish-Browden, 1995, Oxford University Press, New York, USA) verwendet. Dabei wurden die ermittelten spezifischen Aktivitäten zu jeder Inhibitionskinetik bei allen getesteten Inhibitor- und Substratkonzentrationen gegen die jeweiligen Gleichungen für kompetitive (Gleichung 1) und gemischte Inhibition (Gleichung 2) gefittet. Die einzelnen Inhibitionskonstanten (K_i für kompetitive Hemmung bzw. K_{ic} und K_{iu} für gemischte Hemmung) wurden so berechnet, ebenso die Konstanten V_{max} und K_m der jeweiligen Inhibitionskinetiken.

$$\text{Gleichung 1} \quad v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]} \quad \text{(Gleichung für kompetitive Hemmung)}$$

$$\text{Gleichung 2} \quad v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_{ic}}) + [S] (1 + \frac{[I]}{K_{iu}})} \quad \text{(Gleichung für gemischte Hemmung)}$$

[I] entspricht dabei der eingesetzten Inhibitorkonzentration.

Die Regressionsgraphen der Lineweaver-Burk-Plots wurden anhand der aus Leonora 1.0 berechneten Inhibitionskonstanten und kinetischen Parametern angepasst, wobei mit Hilfe des Graphikprogramms GraphPad Prism 4.00 theoretische Kurven simuliert wurden. Für die Darstellung der kompetitiven Hemmung (Gleichung 1) und der gemischten Hemmung (Gleichung 2) nach Lineweaver-Burk wurde jeweils die Reziprokform gebildet (Gleichung 3 und 4)

$$\text{Gleichung 3:} \quad v^{-1} = (K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) * (V_{max})^{-1}) * [S]^{-1} + ((V_{max})^{-1})$$

$$\text{Gleichung 4:} \quad v^{-1} = (K_m (1 + \frac{[I]}{K_{ic}}) * (V_{max})^{-1}) * [S]^{-1} + ((1 + \frac{[I]}{K_{iu}}) * (V_{max})^{-1})$$

In der allgemeinen Geraden-Gleichung $y = mx + b$ entspricht die Variable y dabei v^{-1} , die Variable x entspricht $[S]^{-1}$. Dabei können die Steigungen m und Ordinatenabschnitte c abgeleitet werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ordinatenabschnitte und Steigungen der Geraden in der Lineweaver-Burk-Plots der einzelnen Hemmtypen (Ahlers, 1982).

Hemmtyp	Steigung m	Ordinatenabschnitt c
Kompetitive Hemmung	$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) * (V_{\max})^{-1}$	$(V_{\max})^{-1}$
Gemischte Hemmung	$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}} \right) * (V_{\max})^{-1}$	$\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}} \right) * (V_{\max})^{-1}$

2.11. Spektroskopische Methoden

2.11.1. UV/VIS Spektroskopie

Die Absorptionsspektren der gereinigten Ethylbenzol Dehydrogenase wurden mit einem Lambda 2S-UV/VIS-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) bzw. mit einem ELISA-Gerät (μ -Quant Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) unter reduzierten und oxidierten Bedingungen aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren (200-700 nm) wurde in Quarzküvetten bzw. einer Quarzmikrotiterplatte durchgeführt. Die Spektren wurden gegen den entsprechenden Puffer aufgenommen.

2.11.2. Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

Die Messungen der Elektronenspinresonanz-Spektren wurden von Prof. Dr. Thorsten Friedrich (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Freiburg) ausgeführt.

Probenvorbereitung. Für die gesamte ESR-spektroskopische Analyse der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde das aerob gereinigte und ankonzentrierte Enzym (Endkonzentration: $1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) so eingesetzt wie es nach der Isolierung aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 und anschließender Reinigung vorlag, wobei als letzter Chromatographieschritt nochmals eine DEAE-Sepha-rose durchgeführt wurde. Durch die routinemäßige Zugabe von Ferrizenium-Tetrafluorborat ($100 \text{ } \mu\text{M}$) in die Laufpuffer während der Reinigung lag das Enzym im oxidierten Zustand vor. Alle ESR-Röhrchen wurden mit einem Volumen von $300 \text{ } \mu\text{l}$ befüllt.

Für die Analyse der oxidierten Ethylbenzol Dehydrogenase wurden die ESR-Proben unter aeroben Bedingungen vorbereitet. Dies betrifft die ESR-Proben des unbehandelten Enzyms, wie auch die Proben des Enzyms, welche zuvor mit ansteigenden Konzentrationen Ferrizinium-Tetrafluor-borat (0,3 mM-1 mM) bzw. Wasserstoffperoxid (60 mM) behandelt wurden. Die Probe des Ferrizinium-behandelten Enzyms wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, wohingegen die Wasserstoffperoxid-behandelte Probe zuvor für fünf Minuten inkubiert wurde.

Für die Analyse der reduzierten und Stickstoffmonoxid-inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase wurden die ESR-Proben unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt vorbereitet, wobei das aerob gereinigte Enzym zuvor mit Stickstoff (99,99 % (v/v)) begast wurde, um den restlichen gelösten Sauerstoff aus der Proteinlösung zu entfernen. Die Konzentration von Dithionit betrug 6 mM, diejenige des gasförmigen Inhibitors Stickstoffmonoxid 0,5 mM. Das entspricht einem Anteil von 24 % (v/v) Stickstoffmonoxid in der Gasphase. Die Inkubationszeit der Ethylbenzol Dehydrogenase mit Stickstoffmonoxid betrug fünf Minuten. Die befüllten ESR-Röhrchen wurden mit einem 3-4 cm langem Latexschlauch, der am oberen Ende durch ein Plastikstück verschlossen war, gegen Luft abgedichtet. Anschließend wurden die Röhrchen aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde der Latexschlauch entfernt.

Lagerung der ESR-Proben. Die ESR-Proben wurden entweder in flüssigem Stickstoff oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Ausrüstung. Die ESR-Spektren wurden an einem Bruker EMX-6/1 X-Band ESR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Das Gerät ist ausgerüstet mit einem rechtwinkligen Standard TE 102 Hohlraumresonator und einem ESR-900 Helium-Durchflussskryostaten (Oxford Instruments, Oxford, UK), welcher Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen ermöglicht (10 K-57 K). Die ESR-Spektren wurden unter nicht gesättigten Bedingungen aufgenommen.

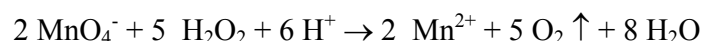
Auswertung der Daten. Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Programms WINEPR (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt.

3. Chemische Methoden

3.1. Bestimmung der Wasserstoffperoxid Konzentration durch Manganometrie

Bevor eine Wasserstoffperoxid-Stammlösung für Inhibitionsversuche eingesetzt wurde, wurde die tatsächliche Konzentration von Wasserstoffperoxid durch Titration mit Kaliumpermanganat er-

mittelt. Die Bestimmung der Konzentration von Wasserstoffperoxids findet in saurer Lösung nach folgender Gleichung statt:



Die Sauerstoffatome des Wasserstoffperoxids werden im Verlauf der Reaktion zu molekularem Sauerstoff oxidiert. Die dabei abgegeben Elektronen werden für die Reduktion des Mangans benötigt. Mangan (VII) wird in saurer Lösung zu Mangan (II) reduziert.

In einem Erlenmeyerkolben wurden folgende Komponenten vorgelegt:

Probenlösung:

Aqua dest.	70 ml
20 % H ₂ SO ₄	30 ml
Wasserstoffperoxidlösung	30 µl

Diese Probenlösung wurde unter ständigem Rühren so lange mit 0,02 M Kaliumpermanganat titriert, bis die sie eine schwache Rosafärbung aufwies. Die tatsächliche Konzentration der Wasserstoffperoxid Stammlösung konnte anhand des Volumen der zugetropften Konzentration von Kaliumpermanganat bestimmt werden.

3.2. Herstellung von Benzoylacetat

Zur Herstellung von Benzoylacetat wurde 5 mg Ethylbenzoylacetat mit 1 ml 1 M NaOH versetzt und 30 min verseift. Dabei entstehen Benzoylacetat und Ethanol. Anschließend wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH 7 neutralisiert.

4. Biophysikalische Methoden

4.1. Redoxtitration

Probenvorbereitung. Für die Redoxtitration der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde 5 ml gereinigtes und ankonzentriertes Enzym (3,5 mg ml⁻¹) eingesetzt. Die Redoxtitration wurde unter anaeroben Bedingungen unter Argon-Atmosphäre bei 25 °C durchgeführt. Dabei wurde die Enzymlösung mit Redoxmediatoren versetzt werden und kontinuierlich gerührt. Redoxmediatoren sind meist Farbstoffe mit einem definierten Redoxpotential. Sie vermitteln den Redoxzustand eines Redoxzentrums eines Enzyms, das meist in die Proteinstruktur eingebunden ist, mit dem

umgebenden Lösungsmittel. Folgende Mediatoren wurden in einer Endkonzentration von 40 μM zugegeben: Kaliumhexacyanoferrat (III), Dimethylparaphenylendiamin, 1,1-Dimethylferrozen, Tetramethylparaphenylendiamin, 2,6-Dichlorophenolindophenol, 1,2-Naphtochinon, Trimethylhydrochinon, Vitamin K3 (Menadion), 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon, Vitamin K1 (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphtochinon, Anthrachinon-2-sulfonat, Neutralrot, Benzylviologendichlorid, Methylviologenhydrat, 2,4-Dinitrophenol (Tabelle 23).

Tabelle 23: Verwendete Redoxmediatoren.

E vs NHE (mV)	E vs Ag/AgCl (mV)	Name	MW (g/mol)	Lösungsmittel
+424	+216	Kaliumhexacyanoferrat(III)	329.3	H ₂ O
+371	+163	Dimethylparaphenylendiamin	172.7	H ₂ O
+341	+133	1,1'-Dimethylferrocen	214.1	EtOH
+270	+62	Tetramethylparaphenylendiamin	164.3	H ₂ O
+217	+9	2,6-Dichlorophenolindophenol	290.1	EtOH
+145	-63	1,2-Naphtochinon	158.2	EtOH
+100	-108	Trimethylhydrochinon	152.2	EtOH
-12	-220	Vit K3 (Menadion)	172.2	EtOH
-125	-333	2-Hydroxy-1,4-naphtochinon	174.2	EtOH
-170	-378	Vit K1 (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphtochinon)	450.7	Aceton
-225	-433	Anthrachinon-2-sulfonat (Natriumsalz)	310.3	H ₂ O
-307	-515	Neutralrot	288.8	EtOH
-360	-568	Benzylviologendichlorid	427.4	H ₂ O
-446	-654	Methylviologenhydrat	257.2	H ₂ O
-500	-708	2,4-Dinitrophenol	184.1	H ₂ O

Die Redoxpotentiale wurden stufenweise mit einer gesättigten Dithionit-Lösung eingestellt. Die Potentiale wurden mit einer Pt-Ag/AgCl Redoxelektrode gemessen. Zur Berechnung des Redoxpotentials gegen das Standardelektronenpotentials (NHE) wurden +208 mV zum angezeigten Potential addiert. Die Proben wurden in ca. 50 mV Schritten mit Dithionit-Lösung reduziert (+219 mV, +165 mV, +116 mV, +28 mV, -38 mV, -76 mV, -130 mV, -200 mV, -252 mV, -374 mV, -462 mV). Nachdem sich ein stabiles Redoxpotential eingestellt hatte, wurde eine Probe von 300 μl entnommen und in ein ESR-Röhrchen überführt. Dieses wurde sofort in eine eiskalte 1:5 Methylcyclohexan/Isopentan-Kältemischung (v/v) getaucht und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zu deren ESR-spektroskopischen Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Probenanalyse. Die Proben wurden ESR-spektroskopisch in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thorsten Friedrich (Institut für Organische Chemie und Biochemie; Freiburg) analysiert. Die Proben wurden mit einem Bruker EMX 6/1 X-Band ESR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) analysiert. Das Gerät ist ausgerüstet mit einem rechtwinkligen Standard TE 102 Hohlraumresonator und einem ESR-900 Helium-Durchflussskryostaten (Oxford Instruments,

Oxford, UK), welcher Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen ermöglicht (10 K-57 K). Die ESR-Spektren wurden unter nicht gesättigten Bedingungen bei 12 K und 60 K aufgenommen. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9,461 GHz, die Modulationsamplitude 6 G, die Modulationsfrequenz 100 kHz, die Zeitkonstante 81,92 ms, die Mikrowellenleistung 10 mW, wobei 1 Scan durchgeführt wurde.

Auswertung der Daten. Zur Auswertung der ESR-Spektren wurde das Programm WINEPR (Bruker, Karlsruhe) verwendet. Mit Hilfe eines Graphikprogramms (Prism 4.00, GraphPad, San Diego, Kanada) wurde die relative Signalamplitude der Resonanzen der ESR-Signale als Funktion des jeweilig angelegten Redoxpotentials (vs. NHE) aufgetragen. Die Mittelpunkt-Redoxpotentiale wurde bestimmt, indem der Plot gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 5) gefittet wurde. Der Wendepunkt der Kurve gibt das Mittelpunkt-Redoxpotential an.

Gleichung 5:
$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]} \quad (\text{Nernst-Gleichung})$$

E (Elektrodenpotential), E° (Mittelpunkt-Redoxpotential), R (Universelle Gaskonstante), T (absolute Temperatur), n (Anzahl der übertragenen Elektronen), F (Faraday-Konstante), [ox]/ [red] (Konzentration des betreffenden Redoxpartners).

Für den Fall, dass die oxidierte Spezies ein Signal zeigt, ergibt sich:

$$[ox] = 1/(1 + \exp(nF(E^{\circ} - E)/RT))$$

In GraphPad Prism 4.00 lautet die Fitgleichung:

$$Y = \exp(n \cdot 39 \cdot X) / (\exp(n \cdot 39 \cdot X) + \exp(n \cdot 39 \cdot A))$$

Für den Fall, dass die reduzierte Spezies ein Signal zeigt, ergibt sich:

$$[red] = 1/(1 + \exp(nF(E - E^{\circ})/RT))$$

In GraphPad Prism 4.00 lautet diese Fitgleichung:

$$Y = \exp(-n \cdot 39 \cdot X) / (\exp(-n \cdot 39 \cdot X) + \exp(-n \cdot 39 \cdot A))$$

n: Anzahl der übertragenen Elektronen (hierbei handelt es sich um eine Ein-Elektronen-Übertragung)

A: Mittelpunkt-Redoxpotential [V]

Y: Signalintensität, normiert auf 1

X: eingestelltes Elektrodenpotential [V]

F/RT = 39 (bei 25°C)

Für den Fall, dass sowohl eine oxidierte als auch eine reduzierte Spezies ein Signal zeigt, lautet diese Fitgleichung in GraphPad Prism 4.00:

$$Y = \exp(n \cdot 39 \cdot X) / (\exp(n \cdot 39 \cdot X) + \exp(n \cdot 39 \cdot A)) - \exp(n \cdot 39 \cdot X) / (\exp(n \cdot 39 \cdot X) + \exp(n \cdot 39 \cdot B))$$

A: Mittelpunkt-Redoxpotential der oxidierten Spezies [V]

B: Mittelpunkt-Redoxpotential der reduzierten Spezies [V]

4.2. Elektrochemisch induzierte Redox-Differenzspektroskopie

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Friedrich am Institut für Organische Chemie und Biochemie in Freiburg durchgeführt. UV-Vis Spektren wurden simultan als Funktion des angelegten Potentials im Bereich von 200 nm bis 600 nm aufgenommen. Es wurde eine elektrochemische Dünnschichtzelle mit optisch-transparentem Fenster aus Quarzglas verwendet. Diese bestand aus einer Dreielektrodenanordnung mit einer Goldnetz-Arbeits Elektrode, einer Platin-Gegenelektrode und Ag/AgCl-Referenzelektrode. Die elektrochemische Analyse wurde mit 30 μl gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase (87 mg ml^{-1}) in Puffer (10 mM TrisAcetat pH 8, 100 mM Kaliumchlorid, 160 mM Kaliumphosphat, 100 μM Ferrizinium-Tetrafluorborat, 10 % Glycerin) bei 6 °C durchgeführt. Die Redox titration wurde durch Zusatz von Redoxmediatoren beschleunigt. Folgende Redoxmediatoren wurden in einer Endkonzentration von 45 μM zugegeben: Tetramethylparaphenylendiamin, 2,6-Dichlorophenolindophenol, 1,2 Naphtochinon, Trimethylhydrochinon, Vitamin K3 (Menadion), 2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon (Tabelle 23). Die Redoxpotentiale wurden stufenweise in 25 mV Schritten eingestellt, wobei bei einem Potential von -84 mV (+137 mV vs. NHE) gestartet wurde. Das UV-Vis Spektrum des Proteins bei -84 mV wurde als Referenz für die Differenzspektren verwendet. Das Protein wurde bis zu einem Potential von +166 mV (+387 mV vs. NHE) oxidiert, wobei die Äquilibrierungszeiten bis zur Einstellung konstanter UV-Vis Spektren des Proteins bei jedem neu eingestellten Potential abgewartet wurden. Diese betrugen jeweils ca. 10 Minuten. Zur Kontrolle wurde das Enzym abschließend wiederum auf -84 mV (+137 mV vs. NHE) reduziert und das UV-Vis Spektrum mit dem ursprünglichen Spektrum verglichen. Die Absorptionen der UV-Vis Spektren wurden bei 600 nm auf die Basislinie korrigiert und bei 280 nm entsprechend der Referenz bei -84 mV normiert. Um Differenzspektren zu erhalten, wurden die jeweiligen UV-Vis Spektren von dem Spektrum bei -84 mV als Referenz abgezogen. Um die Reversibilität der Reduktion und Oxidation zu überprüfen wurde zusätzlich das zweite Kontroll-Spektrum bei -84 mV vom Spektrum bei +141 mV abgezogen. Um das Mittelpunkt-Redoxpotential des Häm *b* Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase zu bestimmen wurde die Differenzwerte der Absorptionen bei 425 nm, 528 nm und 559 nm als Funktion des jeweils angelegten Potentials aufgetragen und mit Hilfe eines Graphikprogramms (Prism 4.00, GraphPad, San Diego, Kanada) gegen die Nernstgleichung gefittet (Gleichung 5).

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Isolierung chromosomaler DNA (nach Thomson und Murray 1980)

Tabelle 24: Material für die Isolierung chromosomaler DNA

70 % (v/v) EtOH	
5 M NaCl	29 g pro 100 ml H ₂ O
10 % (w/v) SDS	10 g SDS in 100 ml H ₂ O
Proteinase K	20 mg Proteinase K in 1 ml TES-Puffer oder H ₂ O
CTAB/NaCl-Lösung:	10 % (w/v) CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), 0.7 M NaCl
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM NaEDTA
CHCl ₃ /Isoamylalkohol	24:1 (v/v)
RNase-Lösung	2 mg/ml RNase A in TES-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl), zweimal 15 min auf 95 °C erhitzt, dazwischen 5 min auf Eis abgekühlt

Pro 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden ca. 60 mg gefrorene Zellen eingewogen und in 570 µl TE-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 30 µl 10 %-ige SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K-Lösung gegeben, der Ansatz gemischt und 1 h bei 50°C inkubiert. Zur Einstellung der Salzkonzentration wurden 100 µl 5 M NaCl-Lösung zugegeben. Zur Fällung von Protein, Zellwand und Polysacchariden wurde anschließend 80 µl einer auf 65 °C aufgewärmten CTAB/NaCl-Lösung zugegeben, gemischt und 10 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze zweimal mit 700 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Mischung extrahiert und je 5 Minuten bei 20.800 g zentrifugiert. Die obere wässrigen Phasen wurden jeweils abgenommen und am Ende mit 400 µl Isopropanol überschichtet. Nach vorsichtigem Mischen der Lösungen wurde ein Knäuel von chromosomaler DNA ausgefällt, das mit einer zu einem Haken ausgezogenen Pasteurpipette in 200 µl 70 % (v/v) EtOH überführt und weitere 5 min bei 20.800 g und 4°C zentrifugiert wurde. Die Flüssigkeit wurde abgezogen, der Niederschlag bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer und 10 µl RNase-Lösung gelöst. Zum Nachweis der isolierten DNA wurden 3 µl der DNA-Probe mit 3 µl Ladepuffer versetzt und in einer Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt.

5.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 5-ml Übernacht-Kulturen in LB/Antibiotika-Medium durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Zellen einer 5 ml-Übernacht-Kultur wurden abzentrifugiert (5000 g, 4 °C, 5 min) und in 200 µl Lösung A (25 mM Tris/ HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert. Der Ansatz wurde 5 min lang bei RT inkubiert. Dann wurden 250 µl Lösung B (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) zur alkalischen Lyse der Zellen zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 5 min lang auf Eis inkubiert. Zur Neutralisierung und Fällung der Proteine wurde 180 µl eiskalte Lösung C (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) zugesetzt. Der Ansatz wurde

gemischt und 5 min lang auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20800 g, 4 °C, 5 min) wurde der erhaltene Überstand mit 400 µl Phenol/Chloroform-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde 2 min lang auf Eis inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (20800 g, 4 °C, 5 min) getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 800 µl eiskaltem Ethanol zur Fällung der DNA versetzt und die Probe 5 min lang auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (20800 g, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 200 µl eiskaltem 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Der Niederschlag wurde mittels Vakuumzentrifugation getrocknet, in 20 µl H₂O aufgenommen, und 2 µl RNase A-Lösung RNase A (Boehringer, Mannheim) wurden zugesetzt.

Für Sequenzierungen wurden Plasmide eingesetzt, die mit dem Qiagen-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert worden waren. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte dabei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Reinigung der DNA über QIAprep Zentrifugations-Säulchen.

5.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

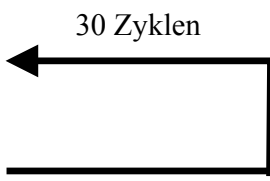
Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Oligonucleotide, die vom 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden Fragments abgeleitet werden, dienen hierbei als Primer für eine thermostabile DNA-Polymerase. Die Methode wurde präparativ zur Amplifizierung von Genen und DNA-Fragmenten sowie analytisch zur Kontrolle von Klonen oder Fragmenten eingesetzt.

Der Standard-Reaktionsansatz (100 µl) enthält:

➤ 10 x PCR-Reaktionspuffer	10 µl
➤ dNTP-Mix (2 mM je Nukleotid)	10 µl
➤ Primer <i>forward</i> (2 pmol/µl)	10 µl
➤ Primer <i>revers</i> (2 pmol/µl)	10 µl
➤ chromosomale DNA	10-50 ng
➤ DMSO	5 µl
➤ Taq-Polymerase	3-4 u
➤ H ₂ O	ad. 100 µl.

Alle Komponenten wurden auf Eis in einem dünnwandigen 500 µl-Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg) gemischt, der Ansatz kurz zentrifugiert und anschließend mit Paraffinöl (75 µl) überschichtet, um ein Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu vermeiden. Die PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler (Techne, Progene) durchgeführt.

Es wurde folgendes **Standardprogramm** verwendet:

95° C	5 min	(Denaturierung)	
95° C	45 sec	(Denaturierung)	
40 - 60° C	45 sec	(Annealing der Primer)	
72° C	1 - 4 min	(Synthese)	
72° C	5 min		
6° C	Pause.		

Die Annealing-Temperatur wurde entsprechend der optimalen Anlagerungstemperatur des jeweiligen Primerpaares gewählt. Die Synthesezeit wurde abhängig der erwarteten Größe des PCR-Produkts gewählt (1 min Synthesezeit pro kb).

Für PCR-Reaktionen in denen ein falscher Nukleotideinbau unbedingt vermieden werden sollte, wurde ein Gemisch aus Taq- und Pfu-Polymerase im Verhältnis 2:1 verwendet. Pfu-Polymerase enthält eine 3'-5'-Exonuklease („*proof reading*“) Funktion. Für diese Reaktionen musste das Standardprotokoll leicht abgeändert werden. Die Primerkonzentration im Testansatz wurde verdoppelt und die Annealing-Temperatur um 5° C herabgesetzt. Zusätzlich wurde die Synthesezeit verdoppelt.

Neben der präparativen PCR zur Gewinnung bestimmter DNA-Fragmente in großer Menge wurde die PCR auch zur Analyse von Klonen oder DNA-Fragmenten eingesetzt. Dafür wurde der Standardansatz bei gleichbleibender Konzentration aller Komponenten auf 25 µl Gesamtvolumen reduziert. Neben isolierter DNA konnten auch einzelne Bakterienklone direkt auf das Vorhandensein bestimmter DNA-Abschnitte hin überprüft werden. Dazu wurde anstelle der DNA eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt und zugegeben.

Die PCR Ansätze wurden durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft. In der Regel wurden dazu 10 µl auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Bei PCR-Produkten, die anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen werden sollten, wurde der PCR-Puffer entfernt, da die eingesetzten Restriktionsenzyme andere Puffer benötigen. Hierfür wurde die DNA gefällt.

5.4. DNA-Fällung

Die DNA-Fällung wurde zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA durchgeführt.

Tabelle 25: Material für die DNA-Fällung

Phenol/Chloroform	25: 24 (v/v)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25: 24: 1 (v/v)
Isopropanol	100 % (v/v)
Ethanol	100 % (v/v)
Ethanol	70 % (v/v)

Die DNA- Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (25:24 (v/v)) versetzt, gemischt und 5 min bei 20.800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 1 Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) versetzt und 5 min bei 20.800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen, mit 3 Volumen 100 % Ethanol (v/v) versetzt und 30 min bei –70 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA 5 min bei 20.800 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde die DNA getrocknet und in einem entsprechenden Volumen Wasser aufgenommen.

5.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen (Gelelution)

Um DNA-Fragmente zu reinigen und um einzelne DNA-Fragmente aus Gemischen zu isolieren wurden die DNA-Fragmente in Agarosegelen getrennt (siehe Material und Methoden 2.7.2.) und anschließend daraus eluiert. Hierzu wurde das Fragment unter mildem UV-Licht (312 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers mit einem QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert.

5.6. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter DNA

Die Konzentration von DNA in Lösung wurde entweder durch Messung der Absorption bei 260 nm mit einem Spektrophotometer (Lambda-2S, Perkin Elmer, Überlingen) bestimmt oder durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der betreffenden aufgetrennten Banden auf Agarosegelen mit den bekannten Mengen ähnlich großer DNA-Fragmente des Molekülmassenstandards. Bei der Konzentrationsbestimmung mittels UV/Vis-Spektroskopie entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Um eventuelle Verunreinigungen der DNA durch Proteine zu kontrollieren, wurde das Verhältnis A_{260}/A_{280} bestimmt. Eine reine DNA-Lösung sollte ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von > 1,6 aufweisen. (Sambrook *et al.*, 1989).

5.7. Klonierungstechniken

Restriktion. Restriktionen von DNA (1-10 µg) mit verschiedenen Restriktionsenzymen (mind. 1 U/µg DNA) wurden nach den Angaben der Hersteller in den jeweils empfohlenen und mitgelieferten 10 x Reaktionspuffern durchgeführt. Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA wurden min-

destens 2 Stunden bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Für Ansätze, in denen zwei verschiedene Restriktionsenzyme gleichzeitig verwendet wurden, wurde ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme möglichst hohe Aktivität aufwiesen. Bei Verwendung von Hitze-inaktivierbaren Enzymen wurden die Ansätze anschließend 10 min lang auf 65 °C erhitzt. Zur Kontrolle der Restriktionen wurden 5 µl der Ansätze durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Ligation. DNA-Fragmente (100 - 200 ng Plasmid-DNA, 200 - 600 ng DNA-Fragment) wurden in 20 µl-Ansätzen mit T4-DNA-Ligase (5 U µl⁻¹; MBI Fermentas, St Leon-Rot) für 2 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 4-18 Stunden bei 14°C in Gegenwart von 1 mM ATP inkubiert. Die Plasmid-DNA und die „Insert“-DNA wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde dann direkt zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen verwendet.

5.8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Ausgehend von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli* Stammes wurde eine 5 ml Übernachtskultur angezogen. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Morgen 250 ml LB-Medium angeimpft. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5-0,7 wurden die Zellen bei 4 °C und 5000 U/min (GSA-Rotor; Sorvall-Zentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 30 ml kalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in einer zum Zellvolumen identischen Menge CaCl₂-Lösung mit 10 % Glycerin aufgenommen. Aliquots zu je 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

5.9. Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (10-40 ng) versetzt. Nach Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock (42 °C, 45 s) wurden die Zellen nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen 30 min bei 37 °C geschüttelt (Thermomixer, Eppendorf 5436). Jeweils 200 µl der inkubierten Ansätze wurden auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und inkubiert (Sambrook et al., 1989).

5.10. Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* Zellen

Ausgehend von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli*-Stammes wurde eine 3,5 ml Übernachtskultur in SOB-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl, ad 1 l H₂O dest.) angezogen. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Morgen 350 ml SOB-Medium angeimpft. Nach Erreichen von OD₆₀₀ 0,5 - 0,7 wurde die Kultur auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4° C und 9000 rpm (GS3-Rotor; Sorvall-Zentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 350 ml 4° C kalter 10 %iger (v/v) Glycerinlösung aufgenommen. Danach wurde die Suspension erneut 10 min bei 4° C und 9000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Zellpellet in 140 ml 4° C kalter 10 %iger (v/v) Glycerinlösung aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden erneut zentrifugiert und anschließend in 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Aliquots zu je 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -70° C gelagert.

5.11. Elektroporation

Der zu transformierende Ligationsansatz wurde zunächst dialysiert. Dazu wurde eine sterile Petrischale mit 25 ml bidest. H₂O gefüllt. Auf das Wasser wurde eine Membran aufgelegt (Millipore GmbH, Eschborn; VSWP 02500, Typ: VS, 0,025 µm Porengröße). Der Ligationsansatz wurde als Tropfen (maximal 30 – 40 µl) auf die Membran pipettiert. Nach 30- bis 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ligationsansatz wieder abgenommen und konnte für die Elektroporation eingesetzt werden. 2 - 10 µl des dialysierten Ligationsansatzes wurden in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Peqlab; Erlangen) pipettiert. Nach Zugabe von 40 µl kompetenter Zellen wurde die Küvette kurz geschüttelt und dann im Elektroporationsgerät (*E. coli*-Pulser, 1,75 kV, 5 msec, Biorad; München) gepulst. Es wurde sofort 1 ml SOC Medium (9,44 ml SOB [siehe 10.4], 0,2 ml 1 M MgCl₂, 0,36 ml 10 % (w/v) Glucose) hinzugegeben, gemischt und der Ansatz in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Zellen wurden anschließend unter Schütteln (180 rpm) 30 - 60 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren, ausgestrichen (100 µl und 2 x 450 µl). Die Platten wurden 12 - 15 Stunden bei 37° C inkubiert.

5.12. *In-vivo*-Überexpression plasmidcodierter Gene in *E. coli*

5.12.1. Klonierung der Benzoylacetat-CoA Ligase

Die Klonierung und Transformation wurde nach Herstellerangaben (Instruction Manual pBAD Directional TOPO® Expression Kit) durchgeführt. Hierfür wurde das Gen der Benzoylacetat-CoA

Ligase (*bal*) aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 über PCR amplifiziert. Das Fragment wurde aufgereinigt und in pBAD102/D-TOPO-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in chemisch-kompetente *E. coli* TOP10 transformiert. Zur Kontrolle der rekombinanten Klone wurden deren Plasmide isoliert und diese mit spezifisch schneidenden Restriktionsenzymen (*EcoRV*) überprüft. Des weiteren wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Primer (pBadTOPO_bcl_for und pBadTOPO_bcl_rev) verwendet, die bereits für die Amplifikation des Fragments verwendet wurden (Tabelle 3).

5.12.2. Überproduktion der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase in *E. coli*

Die heterologe Expression des Gens *bal* in pBAD102/D-TOPO wurde in *E. coli* TOP10 durchgeführt. Die Expression wurde durch einen Arabinose-Promotor kontrolliert und durch Zugabe von Arabinose induziert. Ausgehend von einer Einzel-Kolonie wurden aerobe Übernachtskulturen (5-50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Diese wurden anschließend als Inokulum für die Überexpressionskulturen verwendet. Für analytische Überexpressionen (Kontrolle der Expression unter verschiedenen Anzuchtbedingungen) wurden 0,2 ml der Übernachtskultur in 20 ml LB/Ampicillin-Medium gegeben. Die Kulturen wurden anschließend unter Schütteln in Schikanekolben bei 37 °C bebrütet, bis eine OD₅₇₈ von ca. 0,6 erreicht war. Die Induktion der Kulturen erfolgte durch Zugabe von Arabinose aus einer Stammlösung (0,002% - 20 % (w/v)). Die Endkonzentrationen im Medium betrugen 0,00002 bis 0,2 % Arabinose. Nach Induktion wurden die Kulturen für mindestens 4,5 h inkubiert. Zum Austesten der optimalen Überexpressionsbedingungen wurden die Zellen bei verschiedenen Temperaturen (20 °C oder 37 °C) angezogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1h und 4,5h) wurden Proben (1 ml) entnommen. Neben den transformierten Zellen mit Plasmid pBAD/D-TOPO+*bal* wurden *E. coli* TOP10-Zellen ohne Vektor als Negativkontrolle unter denselben Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 Upm und 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf) geerntet und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Pro 1 ml Kultur mit einer OD₅₇₈=1 wurden 100 µl Probenpuffer eingesetzt. Die Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend 20 µl auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert.

6. Sequenzanalyse

Zum Vergleich von DNA- und Protein-Sequenzen wurden Programme verwendet, die über das Internet frei zugänglich sind. Insbesondere wurde die Datenbank des National Centers für Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) eingesetzt. Die Bearbeitung von DNA- und Protein-Sequenzen erfolgte mit dem Programm Clone (Sci Ed Software; Cary, USA) und multiple Alignments wurden mittels des Programms DNAMAN (Lynnon BioSoft; Quebec, Kanada) durchgeführt.

ERGEBNISSE

1. Die Kristallstruktur der Ethylbenzol Dehydrogenase

1.1. Kristallisierung der Ethylbenzol Dehydrogenase

Die Ethylbenzol Dehydrogenase wurde unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt unter Stickstoff/Wasserstoff Atmosphäre (95 % N₂, 5 % H₂ (v/v)) und bei 20 °C kristallisiert. Um die initialen Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden verschiedene Techniken und Kristallisationspuffer getestet.

1.1.1. Kristallisierung durch die „Microbatch“-Technik

Zuerst wurde versucht, die initialen Kristallisationsbedingungen mit Hilfe der „Microbatch“-Technik zu finden. Dazu wurde je 1 µl Enzymlösung (21 mg ml⁻¹) mit 1 µl Kristallisationspuffer des Jena Bioscience Kristallisations-Screens (JBScreen Crystal Screening Kit, Jena) gemischt und mit Silikonöl überschichtet. Viele Ansätze bildeten bereits nach wenigen Tagen kleine amorphe Kristalle und große, gelblich gefärbte Quasikristalle. Vor allem die Ansätze, die PEG und 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) als Präzipitationsmittel enthielten, lieferten amorphe Kristalle. Diese waren jedoch sehr klein und erschienen sehr ungeordnet; darüber hinaus waren die Ansätze wegen der sehr trockenen Luftverhältnisse im Anaerobenzelt bereits nach wenigen Tagen ausgetrocknet. Auch die Überschichtung der Ansätze mit Paraffinöl, das aufgrund seiner chemischen Beschaffenheit eine langsamere Verdunstung der Ansätze erzielen sollte, erbrachten keine besseren Ergebnisse.

1.1.2. Kristallisierung durch die „Hanging-drop“-Technik

Um das Entnehmen der Kristalle unter anaerober Atmosphäre im Anaerobenzelt technisch einfacher zu machen, wurden die Kristalle zusätzlich mit Hilfe des „Hanging-drop“-Verfahrens gezüchtet. Dazu wurden Tropfen von je 2,5 µl Proteinlösung und 2,5 µl Kristallisationspuffer auf einem runden Deckgläschen vermischt und umgedreht auf das Proteinreservoir gelegt. Doch auch bei dieser Technik musste der Ansatz mit Silikonöl bzw. Paraffinöl abgedichtet werden und trocknete sehr schnell aus. Aus diesem Grund wurde die „Sitting-drop“-Technik als Kristallisationstechnik verwendet.

1.1.3. Kristallisierung durch die „Sitting-drop“-Technik

Diese Technik schien geeigneter für die Kristallisation unter anaerober Atmosphäre zu sein. Die Ansätze trockneten durch das sorgfältige Abkleben der Ansätze mit Tesafilm nicht so schnell aus, wie es bei der „Microbatch“-Technik und der „Hanging-drop“-Technik der Fall gewesen war. Auch bei dieser Technik erwiesen sich die Puffer, die als Präzipitationsmittel PEG und dessen Derivate, wie zum Beispiel PEG-MME, enthielten, als geeignete Wahl. Bereits nach zwei Wochen konnte der erste rötlich gefärbte, würfelförmige Kristall beobachtet werden, der später auch zur Aufklärung der Struktur verwendet wurde (Abbildung 7A). Als initiale Kristallisationsbedingungen wurden 2,5 μl Proteinlösung (21 mg ml^{-1}) mit 2,5 μl Kristallisationspuffer (25 % PEG 550 MME, 0,1 M NaMES pH 6,5, 0,01 M Zn-Sulfat) vermischt.

1.1.4. Optimierung der initialen Kristallisationsbedingungen

Die oben erwähnten initialen Kristallisationsbedingungen waren mit selbst angesetzttem Puffer zunächst nicht zu reproduzieren. Nach mehreren Versuchen, bei denen keine Kristalle gewachsen waren, wurden ausgehend von den „initialen“ Bedingungen die Pufferlösungen variiert. Der verwendete Screening-Puffer hatte wahrscheinlich durch die Lagerung bei den hohen Temperaturen und den extrem trockenen Luftverhältnissen des Anaerobenzeltes an Flüssigkeit verloren und lag daher sehr viel konzentrierter vor. Deshalb wurden folgende Parameter des Puffers verändert: die Konzentrationen des PEG-MME-550, die Konzentration des eingesetzten Salzes, die Puffer-Konzentration und der pH-Wert. Die Variation des pH-Wertes (pH 6,0-7,0 in Schritten von ca. 0,2 pH- Einheiten) hatte keinen Einfluss auf die Bildung von Kristallen, deshalb wurde der pH-Wert der initialen Kristallisationsbedingung (pH 6,5) konstant gehalten. Die Konzentrationen der anderen Parameter wurde schrittweise erhöht, wobei zuerst die Zn-Sulfat und Puffer-Konzentrationen in gleichen Stufen wie das Präzipitationsmittel PEG 550-MME angehoben wurden. Die Erhöhung der Konzentration des PEG-Derivates erfolgte in Schritten von je 5 % und wurde zwischen 25 % und 85 % PEG-550-MME variiert. Die Konzentration des Zn-Sulfates wurde zwischen 3,5 mM und 13,4 mM variiert. Keiner der Ansätze mit PEG-MME Konzentrationen unter 45 % führte zu Kristallen. Die optimale PEG-MME Konzentration lag zwischen 45 % und 50 %, wobei man die Bildung rötlich gefärbter, länglicher Kristalle bis zu einer Kantenlänge von 100 μm beobachten konnte. Dagegen nahm ab einer PEG-MME Konzentration von 65 % die Bildung von Proteinpräzipitat stark zu und es wurden nur sehr kleine Kristalle gebildet.

Das Ansetzen des Puffers war nicht problemlos, da das Zn-Sulfat bei hohen PEG-MME Konzentrationen sofort ausfiel, wenn bei der Einstellung des pH-Werts mit NaOH lokal zu alkalische Werte entstanden. Deshalb wurde der Puffer mit Ausnahme des Zn-Sulfats

fertiggestellt und das Salz erst zuletzt tropfenweise unter Verwendung einer Zn-Sulfat Stammlösung (1M) unter Rühren zugegeben. Die Zn-Sulfat Konzentration, die sich am Besten in Lösung hielt, betrug 3,5 mM. So konnten die folgenden endgültigen Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Zur Kristallisation wurde 2,5 µl Enzymlösung (21 mg ml⁻¹), die vom letzten Reinigungsschritt zusätzlich 10 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 160 mM Kalium-Phosphat (pH 8,0), 10 % Glycerin und 100 µM Ferrizinium-Tetrafluorborat enthielt, mit demselben Volumen Reservoirpuffer (45-50 % PEG-550-MME, 125 mM Na-MES (pH 6,5), 3,5 mM ZnSO₄) inkubiert. Es kann angenommen werden, dass dabei im Anaerobenzelt das Oxidationsmittel Ferrizinium-Tetrafluorborat bereits nach wenigen Stunden zu Ferrozen reduziert wird und die Ethylbenzol Dehydrogenase ebenfalls in den reduzierten Zustand übergeht, so dass in den erhaltenen Kristallen das reduzierte Enzym vorliegen sollte. Nach wenigen Tagen konnte man bereits kleine rötlich gefärbte, würfelförmige oder nadelförmige Kristalle erkennen, die ihre endgültige Größe von 200×100×100 µm³ bzw. 100×100×500 µm³ innerhalb von vier Wochen erreicht hatten (Abbildung 7).

1.1.5. Entnehmen und Einfrieren der Kristalle

Aufgrund der trockenen Luftverhältnisse im Anaerobenzelt war die Reservoirlösung in den Kristallisationsansätzen erheblich verdunstet, so dass auch die PEG-Konzentration so weit anstieg, um als ausreichender Kryoschutz zu dienen. Die Kristalle der Ethylbenzol Dehydrogenase waren nach Entnahme aus dem Anaerobenzelt an der Luft lange genug stabil, um sie intakt in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Allerdings verloren sie unter aeroben Bedingungen innerhalb von 8 Stunden ihre rötliche Farbe und auch ihre Röntgen-Beugungseigenschaften. Vermutlich wurden die Kristalle durch Sauerstoffradikale, die durch das reduzierte Häm-Eisen erzeugt wurden, zerstört.

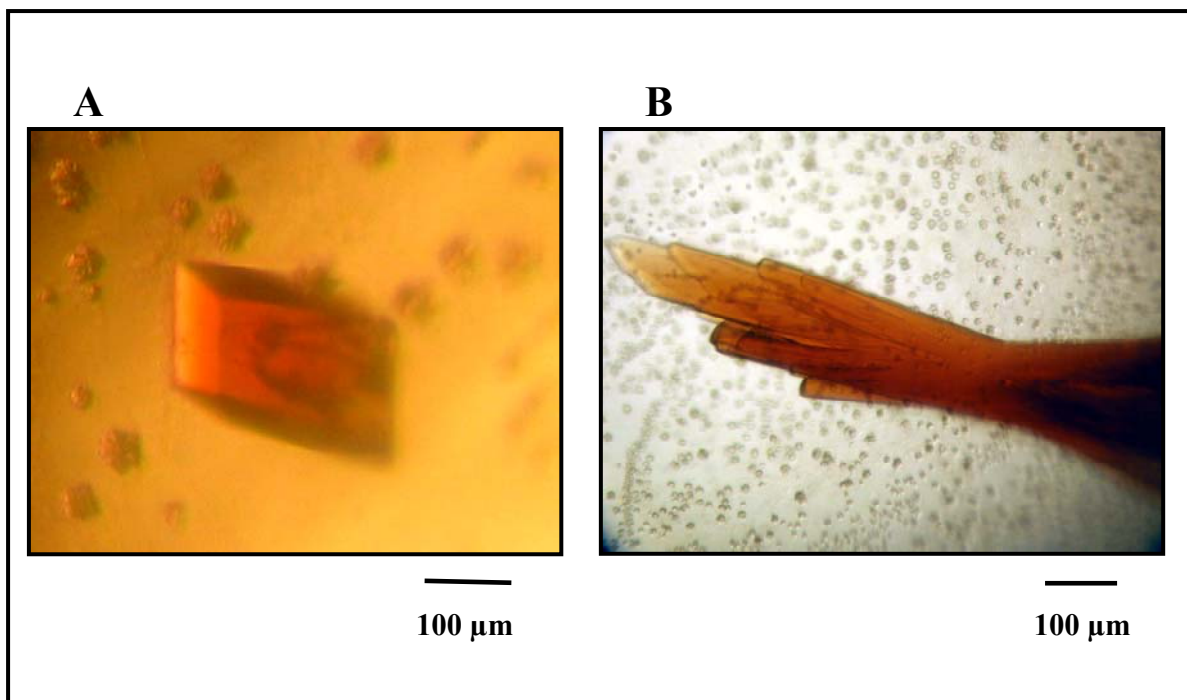


Abbildung 7: Rötlich-gefärbte, würfelförmige (A) und nadelförmige (B) Kristalle der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Fotos wurden nach etwa 2 - 4 Wochen Kristallisationszeit aufgenommen.

1.2 Röntgenstrukturanalyse

Die Erfassung der Röntgenbeugungs-Daten und die Strukturaufklärung der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden in Zusammenarbeit mit der AG Schulz von Daniel Kloer (Institut für Organische Chemie und Biochemie; Freiburg) ausgeführt.

Die Beugungsmuster der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden an der Swiss Light Source (Beamline X06SA, Villigen, CH) aufgenommen. Die maximale Auflösung betrug 1,88 Å (Abbildung 8) bzw. 2,4 Å (erhalten für den Kristall, der für die „single wavelength anomalous diffraction“. (SAD) -Analyse verwendet wurde). Die Kristalle gehören zur Raumgruppe $P2_1$, und es ist jeweils ein heterotrimeres Ethylbenzol Dehydrogenase Molekül pro asymmetrischer Einheitszelle enthalten. Da man von der Ethylbenzol Dehydrogenase wusste, dass sie mehrere Eisen-Schwefel-Zentren in der Alpha- und Beta-Untereinheit besitzt (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2001), wurde ein Datensatz mit Röntgenstrahlen der Frequenz der Eisen-K-Kante aufgenommen, um das abweichende Phasensignal zu maximieren und die Positionen der Fe-S-Zentren durch „single wavelength anomalous diffraction“ (SAD) zu bestimmen.

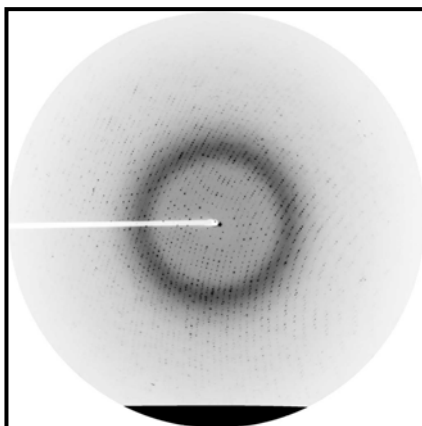


Abbildung 8: Beugungsmuster eines Kristalls der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die maximale Auflösung betrug 1,88 Å.

Unglücklicherweise verursachte der langwellige Röntgenstrahl Schäden am Kristall, so dass aufeinanderfolgende Datenreihen von demselben Kristall hohe R_{iso} -Werte bis zu 15 % zeigten und so die Phasenbestimmung durch Methoden, die mehrfache Wellenlänge verwenden, verhindert wurde. Durch Messung mit einem abgeschwächten Strahl konnte aber schließlich eine brauchbare Datenreihe mit der Wellenlänge der Eisen-K-Kante bestimmt und für eine „single wavelength anomalous diffraction“ (SAD)-Analyse benutzt werden (Tabelle 26). Bei einer Auflösung von 6 Å zeigten die anomalen Unterschiede dabei sechs Streuungsbereiche. Später stellte sich heraus, dass diese Streuungsbereiche tatsächlich die Eisenatome der fünf Eisen-Schwefel-Zentren und des Häm *b* darstellen. Da die einzelnen Eisenatome der Zentren nicht aufgelöst werden konnten, wurden die Phasen nur bei niedriger Auflösung berechnet und anschließend durch die Veränderung der Dichte verbessert. Das führte zu einer Karte mit einer Auflösung von 4,2 Å, welche zahlreiche Alpha-Helices zeigte. Das Model wurde danach durch molekularen Austausch mit der Struktur der homologen Alpha- und Beta-Untereinheiten NarG und NarH der respiratorischen Nitratreduktase von *Escherichia coli* (Bertero *et al.*, 2003) weiter verbessert. Die Nitratreduktase-Struktur wurde auf die fünf erkannten Eisen-Schwefel Zentren positioniert und die Teile der Reduktase, die bei 4,2 Å Auflösung auf die Elektronendichten der Ethylbenzol Dehydrogenase passten, wurden als Teilmodel verwendet. Die Phasen dieses Teilmodels wurden dann experimentell mit den 4,2 Å Phasen kombiniert, um weitere Teile der Struktur zu erhalten. Nach einigen Wiederholungen wurden die Phasen zur vollen Auflösung der Datenreihe von 1,88 Å ergänzt (Tabelle 26), ein komplettes Model erstellt und zu einem guten Qualitätsindex verfeinert (Tabelle 27).

Tabelle 26: Statistiken der Röntgenstrahlendaten^a

Datenreihe	Hohe Auflösung	SAD
Wellenlänge [Å]	1,2400	1,7381
Auflösung ^b [Å]	50 – 1,88 (1,94 - 1,88)	50 - 2,4 (2,6 - 2,4)
Einzelne Reflexionen	127864	116641 ^c
Vollständigkeit ^b [%]	98,0 (80,7)	91,1 (58,8)
Durchschnitt $I/\sigma(I)$ ^b	8,8 (2,8)	9,7 (2,7)
R_{merge} ^b [%]	10,4 (38,5)	13,6 (46,7)
Multiplizität	3,6	5,9 ^c

^a Die Kristalle wurden der Raumgruppe $P2_1$ zugeordnet, die ein heterotrimeres Ethylbenzol Dehydrogenase Molekül pro asymmetrische Einheit besitzt. Die einzelnen Zellparameter waren: $a = 112,5$ Å, $b = 67,3$ Å, $c = 114,8$ Å, $\beta = 111,3^\circ$ für den Kristall der bei hoher Auflösung gemessen wurde und $a = 113,9$ Å, $b = 68,4$ Å, $c = 116,7$ Å, $\beta = 111,7^\circ$ für den Kristall der für die SAD Messung verwendet wurde. Der Lösungsmittelgehalt betrug 50 %. Die gesamten Daten wurden bei 100 K aufgenommen.

^b Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

^c Friedel-Paare wurden als einzelne Reflexionen gewertet.

Tabelle 27: Statistiken der Verfeinerung

Auflösungsbereich [Å]	47 – 1,88
Einzelne Reflexionen	127864
Proteinatome	11571
Kofaktoren und Acetat	250
Wassermoleküle	818
Durchschnitt der B-Faktoren [Å ²] ^a	Hauptkette 24,8 ,Kofaktoren und Acetat 24,0 Wassermoleküle 35,6
rmsd Bindungslängen [Å] / Winkel [deg.]	0,016 / 1,64
R_{cryst} [%] / R_{free} (5% Test Set) [%]	14,8 / 18,3
Ramachandran Statistiken,	begünstigt (%) 97,4 erlaubt (%) 2,5 nicht erlaubt (%) 0,1

^a restliche B -Faktoren nach TLS Verfeinerung. Pro Untereinheit zusammen mit ihren Kofaktoren wurde eine TLS Gruppe verwendet.

1.3. Die Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase

Die Anordnung der Untereinheiten der Ethylbenzol Dehydrogenase ist in Abbildung 9A gezeigt. Die äußere Form des kristallisierten Proteins ähnelt einer Zwergenhmütze, die eine Gesamtgröße von etwa $110 \times 80 \times 50 \text{ Å}^3$ aufweist. Der untere Teil der „Mütze“ wird durch die Alpha-Untereinheit gebildet, die das aktive Zentrum mit dem Molybdän-bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktor (Mo-*bis*MGD) und ein Fe-S Zentrum (FS0) enthält. Die verbleibenden vier Fe-S Zentren FS1 bis FS4, welche die Funktion einer Elektronentransportkette übernehmen, sind in der Beta-Untereinheit lokalisiert. Die Elektronentransportkette erstreckt sich bis zum Häm *b* in der Gamma-Untereinheit, die sich an der Spitze der „Zwergenhmütze“ befindet (Abbildung 9B). Die direkte Entfernung zwischen dem Molybdän und dem Häm-Eisen beträgt 64 Å . Die Gamma-Untereinheit tritt höchst wahrscheinlich mit einem terminalen Elektronenakzeptor in Kontakt, der bis jetzt noch nicht identifiziert ist.

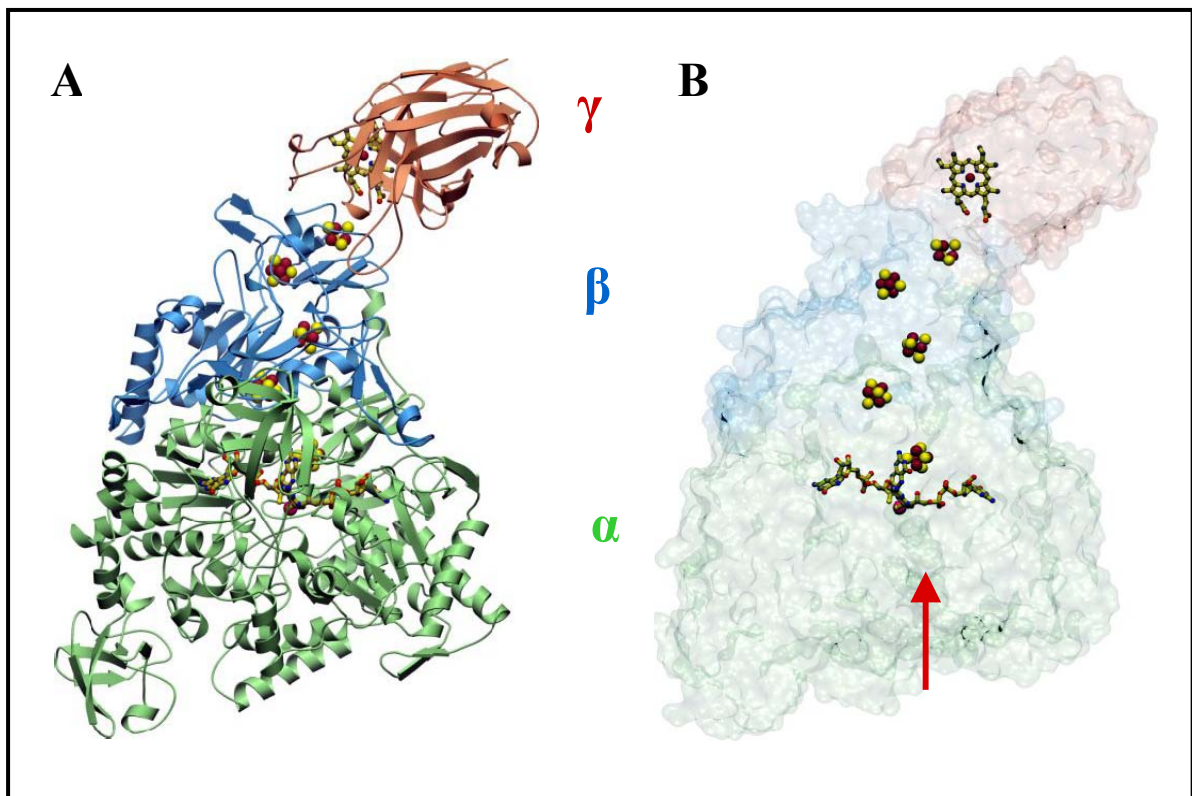


Abbildung 9: Gesamtstruktur der Ethylbenzol Dehydrogenase. (A) Streifendarstellung des 150 kDa Heterotrimeren. Die Alpha-, Beta- und Gamma-Untereinheit sind in grün, blau und rot dargestellt. Das Molybdän, der Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktor (MGD), die Fe-S Zentren und der Häm *b*-Kofaktor sind als Kugel- und -Stab Modell gezeigt. (B) Räumliche Darstellung der redox-aktiven Kofaktoren relativ zur Oberfläche des Enzyms. Alle Kofaktoren sind verborgen und Teil einer Elektronentransportkette, die sich durch alle drei Untereinheiten der Ethylbenzol Dehydrogenase erstreckt. Die gezeigte Oberfläche des Enzyms ist transparent dargestellt und entsprechend der Untereinheiten eingefärbt. Eine tiefe Tasche, die sich von der Basis des Enzyms bis zum aktiven Zentrum erstreckt, ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Die Alpha- und Beta-Untereinheit sind fest miteinander verbunden, während die Gamma-Untereinheit nur losen Kontakt mit der Beta-Untereinheit hat. Die Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten beträgt 4395 \AA^2 , wohingegen diejenige zwischen der Beta- und Gamma-Untereinheit nur 983 \AA^2 umfasst.

Die oligomere Architektur des Ethylbenzol Dehydrogenase Heterotrimers ähnelt der der respiratorischen Nitratreduktase NarGHI (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004) und der Formiat Dehydrogenase-N (Jormakka *et al.*, 2002), wobei die letzteren beiden jedoch Membranenzyme sind und Dimere aus den Heterotrimern, d.h. Hexamere, bilden. Zudem sind jeweils nur die Alpha- und Beta-Untereinheiten dieser Enzyme homolog zu denen der Ethylbenzol Dehydrogenase, die Gamma-Untereinheiten unterscheiden sich jedoch vollständig. Andere Strukturen, die zu denen der Alpha-, Beta- und Gamma-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase strukturell verwandt sind, sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Strukturelle Vergleiche

Enzym, Quelle, Referenz ^a	Zusammen- setzung der Oligomere	verglichene Unter- einheit	Mo Ligand	Sub- familie	Struktur des bisMGD ^b	4Fe-4S Zentrum	andere Ko- faktoren	Alignierte Reste	Identische Reste (%)	Ketten länge	-
Ethylbenzol Dehydrogenase, <i>A. aromaticum</i>	$\alpha\beta\gamma$	α	O δ 2	II	c - o	1	-	-	-	912	
NarG, Nitratreduktase, <i>E. coli</i> (1)	$(\alpha\beta\gamma')_2$	α	O δ 1, O δ 2	II	c - o	1	-	723	26	1244	
NarG, Nitratreduktase, <i>E. coli</i> (2)	$(\alpha\beta\gamma')_2$	α	O δ 2	II	c - c	1	-	723	26	1244	
DMSO Reduktase, <i>R. sphaeroides</i> (3)	α	α	O γ	III	c - c	-	-	598	20	767	
DMSO Reduktase, <i>R. capsulatus</i> (4)	α	α	O γ	III	c - c	-	-	504	22	823	
Pyr-phlo Transhydroxyl., <i>P. acidigalli</i> (5)	$\alpha\beta$	α	O γ	III	c - c	-	-	533	22	875	
Formiat Dehydrogenase-N, <i>E. coli</i> (6)	$(\alpha\beta\gamma')_2$	α	Se γ	I	c - c	1	-	514	18	982	
Formiat Dehydrogenase-H, <i>E. coli</i> (7)	α	α	Se γ	I	c - c	1	-	446	18	697	
NapA, Nitratredukt., <i>D. desulfuricans</i> , (8)	α	α	S γ	I	c - c	1	-	464	19	720	
NapA, Nitratredukt., <i>R. sphaeroides</i> (9)	$(\alpha\beta')_2$	α	S γ	I	c - c	1	-	484	18	789	
Arsenit Oxidase, <i>A. faecalis</i> (10)	$(\alpha\beta')_2$	α	OH ⁻	-	c - c	-	3Fe-4S	479	17	822	
Ethylbenzol Dehydrogenase, <i>A. aromaticum</i>	$\alpha\beta\gamma$	β	-	-	-	3	3Fe-4S	-	-	337	
NarH, Nitrat Reduktase, <i>E. coli</i> (1)	$(\alpha\beta\gamma')_2$	β	-	-	-	3	3Fe-4S	290	46	509	
Pyr-phlo Transhydroxyl., <i>P. acidigalli</i> (5)	$\alpha\beta$	β	-	-	-	3	-	165	32	274	
Formiat Dehydrogenase-N, <i>E. coli</i> (6)	$(\alpha\beta\gamma')_2$	β	-	-	-	4	-	161	30	294	
Ethylbenzol Dehydrogenase, <i>A. aromaticum</i>	$\alpha\beta\gamma$	γ	-	-	-	-	Häm <i>b</i>	-	-	214	
Xylanase 10A, <i>T. maritima</i> (11)	-	C2	-	-	-	-	-	124	12	189	
Cellobiose Dehydr., <i>P. chrysosporium</i> (12)	-	cyt	-	-	-	-	Häm <i>b</i>	96	7	186	
Fab Fragment, <i>M. musculus</i> (13)	-	V _H	-	-	-	-	-	75	7	120	

^a (1) Code 1Q16, Bertero *et al.*, (2003); (2) 1R27, Jormakka *et al.*, (2004); (3) 1EU1, Schindelin *et al.*, (1996); (4) 4DMR, McAlpine *et al.*, (1998); (5) 1VLD, Messerschmidt *et al.*, (2004); (6) 1KQF, Jormakka *et al.*, (2002); (7) 1AA6, Boyington *et al.*, (1997); (8) 2NAP, Dias *et al.*, (1999); (9) 1OGY, Arnoux *et al.*, (2003); (10) 1G8K, Ellis *et al.*, (2001); (11) Carbohydrat-bindende Domäne, 1I82, Notenboom *et al.*, (2001); (12) Cytochrom Domäne, 1D7B, Hallberg *et al.*, (2000); (13) 2H1P, Young *et al.*, (1997).

Buchstaben c - c bedeuten, dass beide MGD einen geschlossenen Pyranring besitzen, wohingegen c - o dafür steht, dass ein Ring geschlossen ist und der andere offen ist.

2. Kinetik der Ethylbenzol Dehydrogenase

2.1. Substratspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase

Bereits in früheren Studien wurde entdeckt, dass die Ethylbenzol Dehydrogenase neben dem eigentlichen Substrat Ethylbenzol noch andere Verbindungen umsetzt, deren aromatischer Ring entweder eine Ethyl- oder Propylgruppe trägt (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2001; Szaleniec *et al.*, 2006). Um mehr über den Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase herauszufinden, wurden weitere Ethylbenzol-ähnliche Substrate getestet. In dieser Arbeit wurden 4-Ethylanisol, 4-Ethylbenzoat, 4-Ethylbiphenyl, 2-Ethylthiophenol, 1-Bromo-2-Ethylbenzol, 1-Bromoethylbenzol, Hexamethylbenzol, 2-Fluorotoluol, als Ethyl-substituierten Substratanaloga getestet. Von diesen wurden 4-Ethylanisol und 4-Ethylbiphenyl als Substrate umgesetzt. 4-Ethyl-anisol wurde im Vergleich zu Ethylbenzol mit Raten von $25 \pm 1 \%$ bei 30 °C und von $34 \pm 2 \%$ bei 55 °C umgesetzt. Bei 4-Ethylbiphenyl lagen die relativen Umsatzraten bei zu $51 \pm 4 \%$ (30 °C) und bei $120 \pm 12 \%$ (55 °C) (Abbildung 10). Die Umsetzungsraten von Ethylbenzol (100 %-Werte) lagen dabei bei spezifischen Aktivitäten von $0,5\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}\text{ (mg Protein)}^{-1}$ bei 30 °C und $1,4\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}\text{ (mg Protein)}^{-1}$ bei 55 °C . Andere getestete Substratanaloga, wie 4-Ethylbenzoat, 2-Ethylthiophenol, 1-Bromo-2-Ethylbenzol, 1-Bromoethylbenzol, Hexamethylbenzol, 2-Fluor-toluol, wurden nicht umgesetzt.

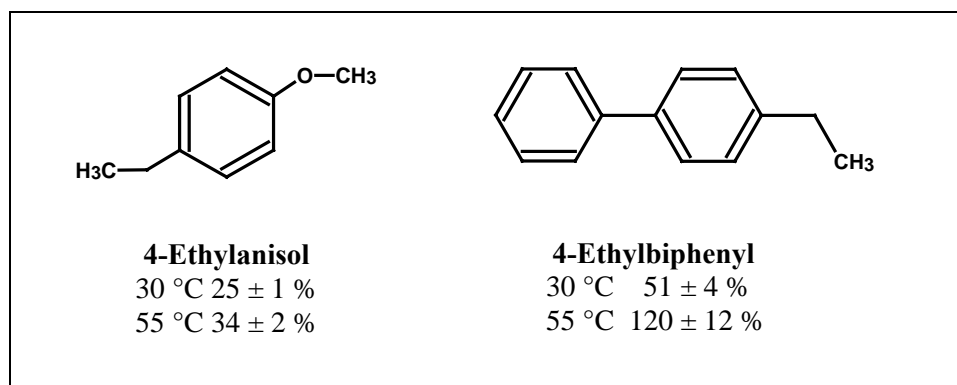


Abbildung 10: Alternative Substrate der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Aktivitäten wurden nach dem in Material und Methoden 2.4.1. beschriebenen photometrischen Enzymtest bestimmt. Die relativen Aktivitäten beziehen sich auf die Umsetzung von Ethylbenzol, welche als 100 % gesetzt wurde. Die spezifische Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase betrug $0,5\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}\text{ (mg Protein)}^{-1}$ bei 30 °C und $1,4\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}\text{ (mg Protein)}^{-1}$ oxidiertem Ethylbenzol bei 55 °C . Es wurde jeweils $0,5\text{ mM}$ Substrat eingesetzt. Weitere Substratanaloga sind in Diskussion 2.1. zu finden.

2.2. Inhibitorspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase

2.2.1. Inhibition durch Substrat-ähnliche Verbindungen

Viele der getesteten Substratanaloga, die durch die Ethylbenzol Dehydrogenase nicht umgesetzt wurden, zeigten inhibitorische Effekte auf das Enzym (Abbildung 11). Die bisher gefundenen Inhibitoren der Ethylbenzol Dehydrogenase können in mehrere Gruppen eingeteilt werden (i) Substratanaloga, die Methylgruppen enthalten, wie Toluol und 2-Fluortoluol (ii) Methoxy-Verbindungen, wie Anisol, (iii) einige Ethyl-substituierte aromatische Verbindungen wie 2-Diethylbenzol, 4-Ethylpyridin, 4-Ethylbenzoat, 1-Bromoethylbenzol, 1-Bromo-2-Ethylbenzol, 2-Ethylthiophenol, (iv) alkoholische Verbindungen, wie das Reaktionsprodukt (*S*)-1-Phenylethanol, (*R*)-1-Phenylethanol, (*S*)- und (*R*)-1-Phenylethylamin und (*S,R*)-1-(2-Naphtyl)ethanol und (v) andere nicht Substrat-ähnliche Verbindungen, wie Ferricyanid, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid.

Alle eingesetzten Verbindungen, außer dem Reaktionsprodukt (*S*)-1-Phenylethanol und seinem Enantiomer (*R*)-1-Phenylethanol, inhibierten die Aktivität bereits bei einer eingesetzten InhibitorKonzentration von 1 mM. So sinkt die Ethylbenzol Dehydrogenase-Aktivität in Gegenwart von 1 mM (*S*)- bzw. (*R*)-1-Phenylethylamin auf 27 % bzw. 28 % und in Gegenwart von 1-(2-Naphtyl)-ethanol auf 23 % der ursprünglichen Aktivität. Ähnliche Aktivitätsverluste wurden mit (*S*)- bzw. (*R*)-1-Phenylethanol erst bei einer Konzentration von 12,5 mM beobachtet. Die Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase wird in Gegenwart von 1 mM Toluol auf 48 % verringert, doch durch ein zusätzlich substituiertes Fluoratom, bei 2-Fluortoluol, fällt der inhibitorische Effekt um ca. 1,6-fach geringer aus. Vergleicht man die inhibitorischen Effekte durch (1-Bromomethyl)benzol und 1-Brom-2-Ethylbenzol, ist derjenige Inhibitor stärker, dessen Bromatom direkt am Ring substituiert ist. Unter den anderen Ethyl-substituierten Kohlenwasserstoffen inhibieren diejenigen Verbindungen am stärksten, die entweder eine weitere Ethylgruppe oder eine Thiogruppe in ortho-Stellung besitzen, wie 1,2 Diethylbenzol und 2-Ethylthiophenol. Bereits in Gegenwart von 1 mM 2-Ethylthiophenol verlor das Enzym seine gesamte Aktivität. Deshalb wurde die Hemmung des Enzyms durch diesen Inhibitor noch näher untersucht. Die Konzentration von 2-Ethylthiophenol, die notwendig ist um 50 % der Enzymaktivität zu inhibieren (IC_{50}) beträgt ca. 140 μ M (Abbildung 12). Nachdem Ethylbenzol Dehydrogenase mit 1 mM 2-Ethylthiophenol für 5 Minuten vorinkubiert und anschließend auf Enzymaktivität überprüft worden war, betrug diese 80 %, im Vergleich zur Aktivität eines Kontrollansatzes ohne Inhibitor. Dabei betrug die Inhibitor-Endkonzentration im Enzym-Aktivitätstest-Ansatz immer noch 9,5 μ M. Das bedeutet, die Ethylbenzol Dehydrogenase lässt sich durch 2-Ethylthiophenol nicht inaktivieren und ist damit vermutlich ein reiner Inhibitor.

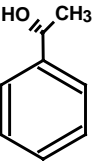
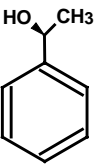
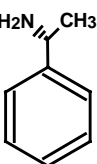
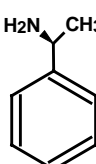
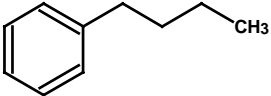
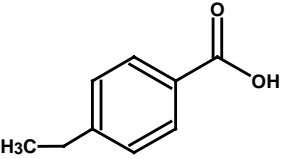
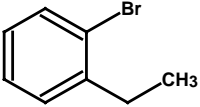
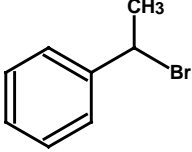
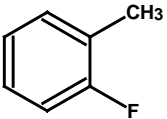
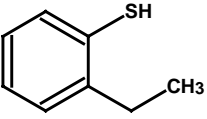
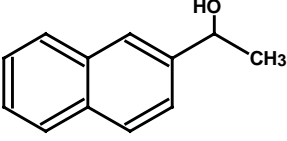
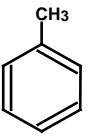
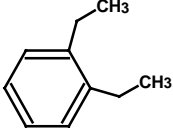
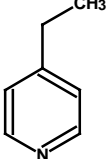
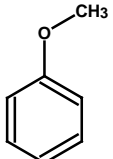
			
(<i>R</i>)-1-Phenylethanol 100 % (37 %)	(<i>S</i>)-1-Phenylethanol 100 % (35 %)	(<i>R</i>)-1-Phenylethylamin 28 %	(<i>S</i>)-1-Phenylethylamin 27 %
			
n-Butylbenzol 62 %	4-Ethylbenzoat 78 %	1-Brom-2-Ethylbenzol 57 %	1-Brom-ethylbenzol 71 %
			[Fe(CN) ₆] ³⁻
2-Fluortoluol 78 %	2-Ethylthiophenol 0 %	1-(2-Naphtyl) ethanol 23 %	Ferricyanid 27 ± 0,6 %
			
Toluol 48 ± 0,5 %	1,2 Diethylbenzol 24 ± 3.6 %	4-Ethylpyridin 62 %	Anisol 23 ± 1 %

Abbildung 11: Inhibitorspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die relativen Aktivitäten, die unterhalb der Strukturformeln gezeigt sind, zeigen die Rest-Aktivität des inhibierten Enzyms und beziehen sich auf die Umsetzung von 1 mM Ethylbenzol ohne Inhibitor, welche als 100 % gesetzt wurde. Die spezifische Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase betrug $1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die Rest-Aktivitäten wurden in Gegenwart von 1 mM Ethylbenzol gemessen mit jeweils 1 mM Inhibitor im Testansatz. Die Aktivitäten wurden bei 55 °C nach dem in Material und Methoden 2.4.1. beschriebenen photometrischen Enzymtest gemessen. Da die Ethylbenzol Dehydrogenase in Gegenwart von 1 mM (*S*)- bzw. (*R*)-1-Phenylethanol keine Hemmung zeigte, wurden die Messungen in diesem Fall zusätzlich mit jeweils 12,5 mM Inhibitor durchgeführt. Die hierauf bezogenen relativen Aktivitäten sind in Klammern gezeigt.

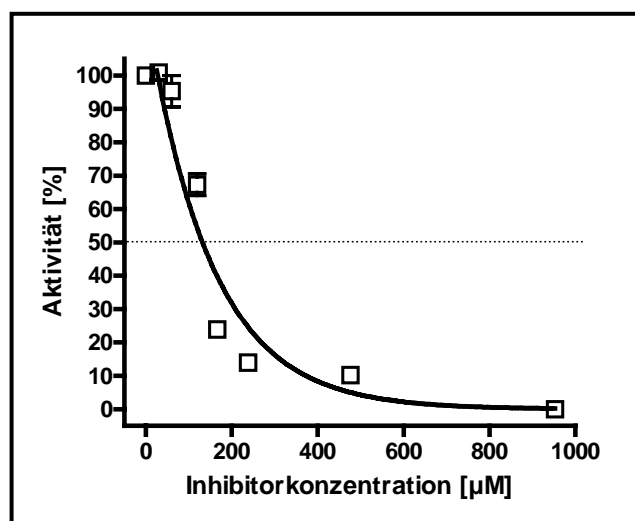


Abbildung 12: Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 2-Ethylthiophenol. Die relative Aktivität bezieht sich auf die Umsetzung von Ethylbenzol ohne Inhibitor, welche als 100 % gesetzt wurde. Die spezifische Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase betrug $2,8 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die Messung der Aktivitäten erfolgte nach dem in Material und Methoden 2.4.1. beschriebenen photometrischen Enzymtest bei 55°C . Die gestrichelte Linie markiert 50 % Aktivität.

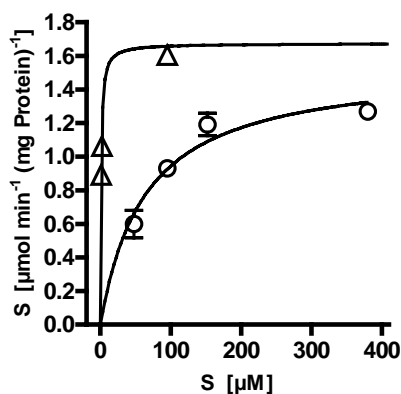
Während 3-Ethylpyridin im Vergleich zu Ethylbenzol zu $17 \pm 0,75\%$ oxidiert wird (Szaleniec *et al.*, 2006), wird 4-Ethylpyridin nicht umgesetzt und wirkt im Gegensatz dazu als moderater Inhibitor. Auch das Ethyl-substituierte 4-Ethylbenzoat inhibiert die Oxidation von Ethylbenzol, wobei die Aktivität des Enzyms auf 78 % sinkt. Das Substratanalogon Anisol, in dem das C2-Atom des Ethylbenzols durch Sauerstoff ersetzt ist, wurde als ein starker Inhibitor identifiziert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit 4-Ethylanisol, das vermutlich wegen der zusätzlichen Ethylgruppe vom Enzym umgesetzt werden kann (Abbildung 11).

Frühere Studien zum Substratspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase zeigten, dass Benzol-Derivate mit C3-Kohlenwasserstoffseitenketten wie das n-Propylbenzol mit geringer Rate umgesetzt werden (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Das um noch ein C-Atom längere n-Butylbenzol wird dagegen nicht mehr umgesetzt, wirkt jedoch als moderater Inhibitor des Enzyms (Abbildung 11). Weitere Verbindungen, die getestet wurden, aber keine inhibitorische Wirkung auf die Ethylbenzol Dehydrogenase haben, sind Hypophosphit (1 mM) und Hexamethylbenzol (1 mM).

Der K_m -Wert des natürlichen Substrats Ethylbenzol der Ethylbenzol Dehydrogenase liegt bei $< 1 \mu\text{M}$, wenn wässrige Ethylbenzol-Stammlösungen verwendet werden (M. Szaleniec, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurden die Ethylbenzol-Stammlösungen zur Ermittlung der Enzymkinetik zunächst mit Isopropanol als Lösungsmittel angesetzt. Dabei ergab sich aber, dass hohe Isopropanol-Konzentrationen den K_m -Wert des Enzyms beeinflussen. In Gegenwart von 0,5 mM Isopropanol steigt der K_m -Wert für Ethylbenzol auf $64 \mu\text{M} \pm 17 \mu\text{M}$ (Abbildung 13).

Die Verbindung ist damit ein weiterer Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Im Vergleich dazu lag der K_m für Ethylbenzol in Gegenwart von 0,5 mM tert-Butanol nur bei $0,9 \mu\text{M} \pm 0,3 \mu\text{M}$ (Abbildung 2a). Der V_{\max} -Wert änderte sich in beiden Fällen nicht und lag bei $1,6 \pm 0,09 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Deshalb wurde tert-Butanol nachfolgend als Lösungsmittel für Ethylbenzol und die Inhibitoren eingesetzt.

A



B

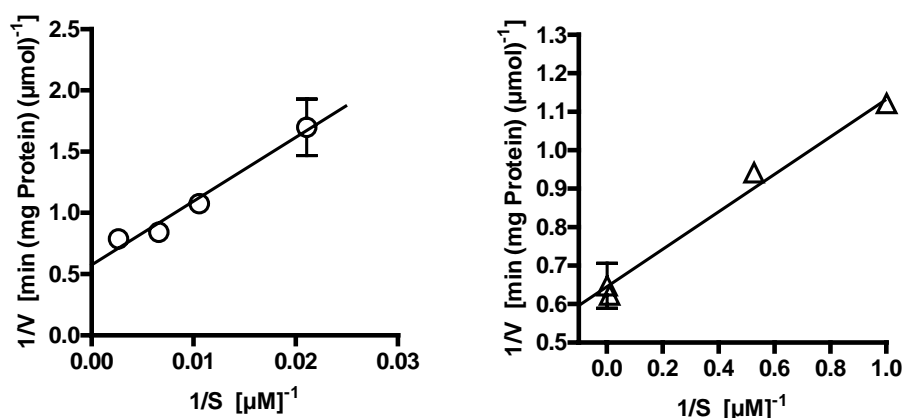


Abbildung 13: Sättigungskurven und Lineweaver Burk-Plots der Ethylbenzol Dehydrogenase in Gegenwart von Isopropanol und tert-Butanol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 0,5 mM tert-Butanol (Dreiecke) und Isopropanol (Kreise).

2.2.2. Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Ferricyanid

Des weiteren wurde Ferricyanid als Inhibitor getestet, da diese Verbindung ein ähnlich starkes Oxidationsmittel wie das Ferrizenium-Ion darstellt (Mittelpunkt-Redoxpotential Ferrocyanid/Ferricyanid = + 360 mV; Orringer *et al.*, 1979), aber dennoch nicht als Elektronenakzeptor zur Messung der Ethylbenzol Dehydrogenase-Aktivität dient (Prof. J. Heider, persönliche Mitteilung). Tatsächlich hemmt Ferricyanid die Ethylbenzol Dehydrogenase; die Aktivität sinkt in Anwesenheit von 1 mM Ferricyanid auf $27 \pm 0,6 \%$ (Abbildung 11).

2.2.3. Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Wasserstoffperoxid

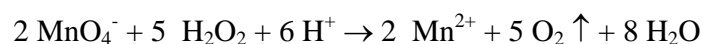
Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist sauerstoffempfindlich, allerdings nur in ihrer reduzierte Form. Das reduzierte Enzym verliert unter aerober Atmosphäre innerhalb von 7 Minuten die Hälfte seiner Aktivität (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Man kann deshalb vermuten, dass Luftsauerstoff mit dem Häm *b* Kofaktor des Enzyms reagiert, welcher im reduzierten Zustand reaktive Intermediate, wie Superoxid oder Wasserstoffperoxid bilden würde, die ihrerseits wieder das Enzym schädigen. Deshalb war es interessant zu testen, wie sich Wasserstoffperoxid auf die Aktivität des Enzyms auswirkt.

Die Messung der Enzymaktivitäten wurde mit oxidiertem Ethylbenzol Dehydrogenase bei 55 °C und nach dem in Material und Methoden 2.4.1. beschriebenen photometrischen Aktivitätstest gemessen.

Konzentrationsabhängige Inaktivierung durch Wasserstoffperoxid

Oxidierte Ethylbenzol Dehydrogenase (12,5 µM) wurde direkt vor der photometrischen Aktivitätsbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen von H₂O₂ (0 mM bis 147 mM) für 5 Minuten auf Eis inkubiert (Abbildung 14).

Da Wasserstoffperoxid-Stammlösungen sich mit der Zeit spontan zersetzen, wurde die tatsächlich eingesetzte Wasserstoffperoxid-Konzentration dabei durch Titration mit 0,02 M Kaliumpermanganat ermittelt. Die Bestimmung der Konzentration von Wasserstoffperoxid findet in saurer Lösung nach folgender Reaktionsgleichung statt:



Die Sauerstoffatome des Wasserstoffperoxids werden im Verlauf der Reaktion zu molekularem Sauerstoff oxidiert. Die dabei abgegebenen Elektronen werden für die Reduktion des Mangan (VII) in saurer Lösung zu Mangan (II) benötigt. Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration der Stammlösung wurde ein definiertes Volumen Wasserstoffperoxid-Lösung in schwefelsaurer Lösung vorgelegt. Diese Probenlösung wurde unter ständigem Rühren so lange mit 0,02 M Kaliumpermanganat titriert, bis sie eine schwache Rosafärbung aufwies. Die tatsächliche Konzentration der Wasserstoffperoxid-Stammlösung wurde anhand der Menge des zugegebenen Kaliumpermanganats bestimmt.

Nach Zugabe von 147 mM H₂O₂ war das Enzym inaktiv. Die Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase korrelierte mit der eingesetzten H₂O₂ Konzentration. Jedoch ist die nötige Konzentration an H₂O₂ für die vollständige Inaktivierung im Vergleich zur eingesetzten

Enzymkonzentration ($12,5 \mu\text{M}$) um ein vielfaches höher (ca. 12000-fach), so dass vermutlich keine stöchiometrische Beziehung zwischen der eingesetzten H_2O_2 Konzentration und inaktivierten Kofaktoren besteht.

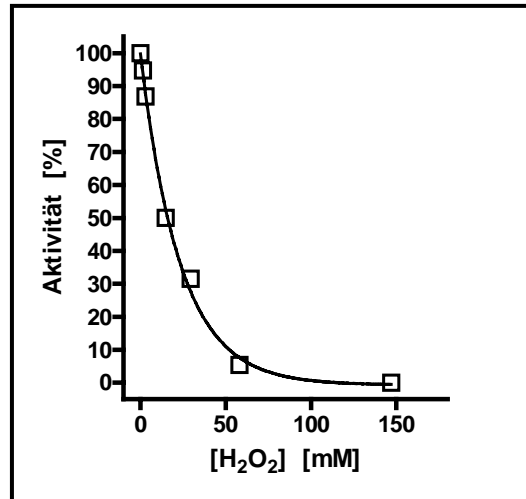


Abbildung 14: Inaktivierung der EBDH mit H_2O_2 . 100 % relative Aktivität entspricht einer spezifischen Enzymaktivität von $0,38 \mu\text{mol} (\text{min} (\text{mg Protein}))^{-1}$.

Zeitabhängige Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die zeitabhängige Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde in Gegenwart von 15 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verfolgt. Eine vollständige Inaktivierung des Enzyms trat bei einer Proteinkonzentration von $12,5 \mu\text{M}$ und 15 mM H_2O_2 innerhalb von 115 Minuten auf (Abbildung 15). Als 100 % wurde die Aktivität festgelegt, welche nach 115 Minuten Inkubation mit einem Kontrollansatz ohne H_2O_2 gemessen wurde ($0,19 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Das Enzym konnte anschließend nicht mehr durch Inkubation mit dem Reduktionsmittel Na-Dithionit (10 mM) reaktiviert werden. Vermutlich handelt es sich also um eine irreversible Inaktivierung.

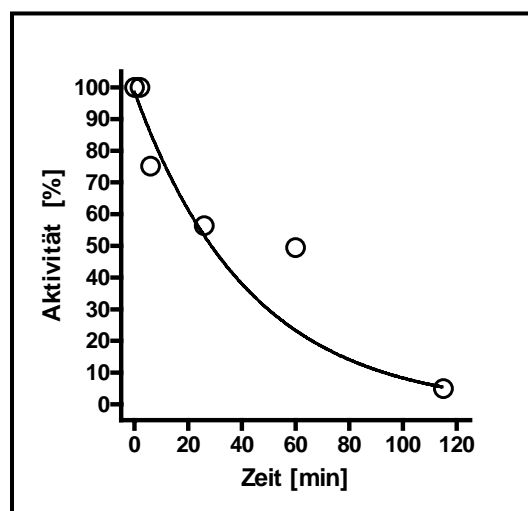


Abbildung 15: Zeitabhängige Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 15 mM H_2O_2 . 100 % Aktivität entspricht $0,19 \mu\text{mol} (\text{min} (\text{mg Protein}))^{-1}$ oxidiertes Ethylbenzol.

2.2.4. Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Stickstoffmonoxid

Niedermolekulare Verbindungen wie Stickstoffmonoxid (NO) sind als multifunktionale Moleküle bekannt. Eine Funktion von Stickstoffmonoxid ist die Inaktivierung biologisch wichtiger Proteine, zum Beispiel mitochondrialer Atmungsenzyme oder der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GADPH), die eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung spielt (Dimmeler *et al.*, 1993), der Ribonukleotidreduktase, welches ein wichtiges Enzym für die Proteinsynthese ist (Lepoivre *et al.*, 1991) und auch einiger Molybdänenzyme, wie die zum Beispiel der Xanthinoxidase (Fukahori *et al.*, 1994). Dabei sind besonders die Reaktionen von NO mit Häm-Enzymen von offensichtlicher biologischer Bedeutung. Die gut charakterisierte Guanylat Cyclase der Säugetiere und die bakterielle NO-Reduktase sind Enzyme, die beide ein Häm-Eisen besitzen und deshalb ein Ziel für die Interaktion mit Stickstoffmonoxid darstellen (Cooper, 1998). Da auch die Ethylbenzol Dehydrogenase ein Häm *b* als Kofaktor trägt, wurde die Inaktivierung durch Stickstoffmonoxid genauer untersucht.

Oxydierte Ethylbenzol Dehydrogenase (13 μM) wurde direkt vor der photometrischen Aktivitätsbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Stickstoffmonoxid (wässrige Konzentration von 0 mM bis 1,3 mM) bei 20 °C für 5 Minuten inkubiert und anschließend getestet (Abbildung 16). Nach Zugabe von 1,3 mM NO war das Enzym nahezu inaktiv. Die NO-Konzentration, bei welcher das Enzym 50 % seiner Aktivität verloren hatte (IC_{50}), betrug 0,35 mM und lag damit nur ca. 10-fach höher als die eingesetzten Enzymkonzentration (26 μM).

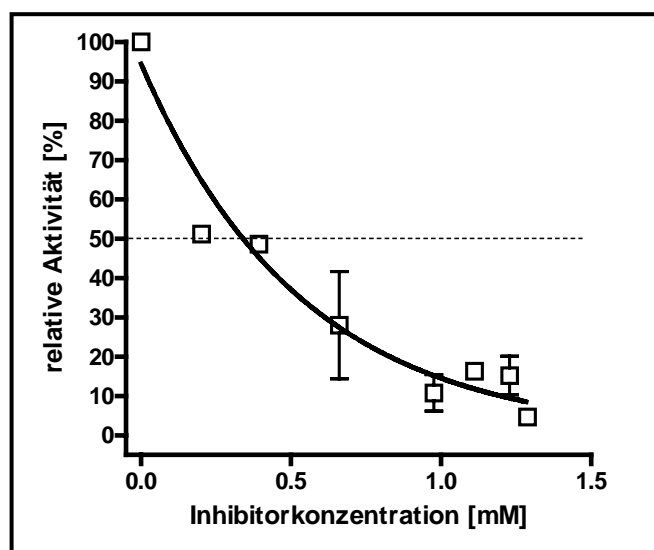


Abbildung 16: Stickstoffmonoxid-abhängige Inaktivierung der Ethylbenzol Dehydrogenase. 100 % relative Aktivität entspricht einer spezifischen Aktivität von $2,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die angegebene NO-Konzentration entspricht der Konzentration an gelöstem NO in der wässrigen Phase. (berechnet nach der Löslichkeit von NO in Wasser; ca. 0,062 g/l).

Um zu überprüfen, ob es sich bei Stickstoffmonoxid um einen irreversiblen Inaktivator der Ethylbenzol Dehydrogenase handelt und Hinweise auf die Art der Inhibition zu erhalten, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dabei wurde das Enzym (13 μM) mit konstanter NO-Konzentration (310 μM ; entspricht 15 % NO in der Gasphase) für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das auf diese Weise vorinkubierte Enzym in den Aktivitätstest eingesetzt, wobei die NO-Konzentration durch Verdünnung mit dem Testpuffer nur noch 3 μM betrug. Danach wurde die Enzymkinetik aufgenommen und mit unbehandeltem Enzym verglichen. Dabei wurden die Substratkonzentrationen zwischen 9 und 970 μM Ethylbenzol variiert. Fits der Messdaten mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 6) ergab einen V_{max} -Wert von $1,29 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ für die Kontroll-Messreihe mit unbehandeltem Enzym, welcher bei den Ansätzen mit 3 μM NO auf $0,76 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ sank (Abbildung 17). Dagegen stieg K_m von $0,57 \pm 0,21 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne NO auf $20,8 \pm 4,3 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit 3 μM NO.

Die prinzipielle Reversibilität der Effekte durch NO lässt darauf schließen, dass Ethylbenzol Dehydrogenase bereits durch geringe NO-Konzentrationen inhibiert, aber vermutlich nicht inaktiviert wird. Der 40-fach höhere K_m -Wert bei der Messreihe mit 3 μM NO gegenüber der Kontroll-Messreihe ohne Inhibitor und der auf 59 % verringerte V_{max} -Wert deuten an, dass die niedermolekulare Verbindung NO vermutlich ein gemischter Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase ist. In diesem Fall würden die Inhibitionskonstanten für gemischte Hemmung $5,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (K_{ic}) und $316 \pm 21 \mu\text{M}$ (K_{iu}) betragen. Um jedoch die Inhibitionskonstanten und den Hemmtyp der Ethylbenzol Dehydrogenase durch NO zu bestätigen, müsste überprüft werden, ob sich die vorläufigen Inhibitionsdaten in Gegenwart von nicht-vorinkubiertem Enzym und 3 μM NO bestätigen.

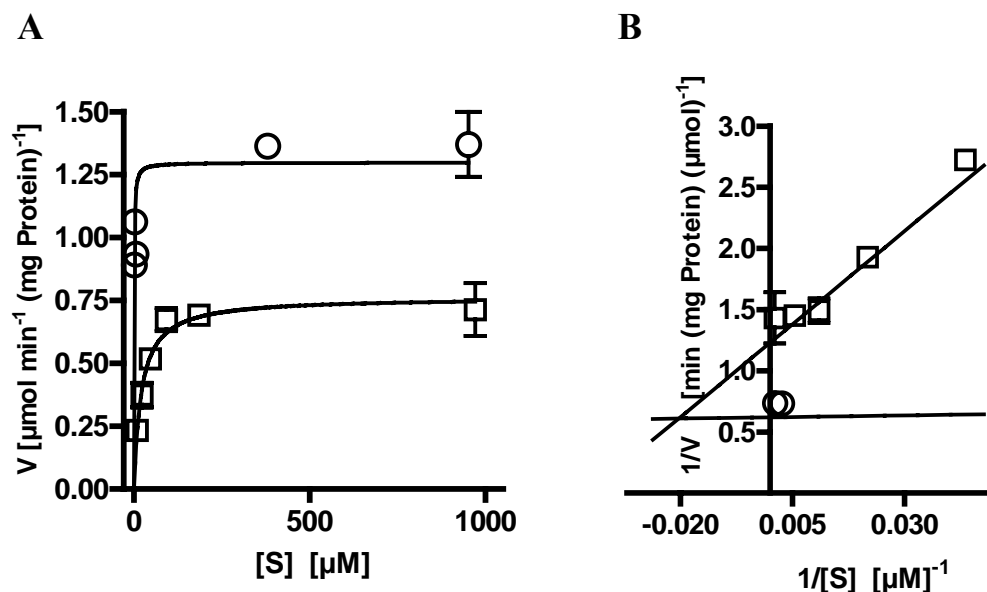


Abbildung 17: Sättigungskurve und Lineweaver Burk-Plot der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Stickstoffmonoxid. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 310 μM (Vierecke) und 0 μM Stickstoffmonoxid (Kreise).

2.3. Inhibitionskinetiken

Um mehr über den Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase herauszufinden und geeignete Kandidaten für Co-Kristallisationsexperimente zu finden, wurden mit einigen der gefundenen Inhibitoren der Ethylbenzol Dehydrogenase die Inhibitionskinetiken genauer untersucht. Dies waren im Einzelnen (i) Substratanaloga, die Methylgruppen enthalten, zum Beispiel Toluol; (ii) Methoxy-Verbindungen, wie Anisol; (iii) einige Ethyl-substituierte aromatische Verbindungen, zum Beispiel 1,2-Diethylbenzol, 4-Ethylpyridin und 2-Ethylthiophenol und (iv) alkoholische Verbindungen, wie das Reaktionsprodukt (*S*)-1-Phenylethanol und 1-(2-Naphtyl)ethanol. Alle Inhibitionskinetiken wurden mit gereinigter oxidierte Ethylbenzol Dehydrogenase aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 (Proteinkonzentration 4 mg ml⁻¹) mit dem in Material und Methoden 1.4.1. beschriebenen photometrischen Enzymtest bei 55 °C durchgeführt. Für die Messungen wurde das Substrat Ethylbenzol und die jeweiligen Inhibitoren in tert-Butanol gelöst. Durch Kontrollversuche wurde vorher ausgeschlossen, dass die Ethylbenzol Dehydrogenase durch tert-Butanol gehemmt wird oder dass tert-Butanol als Substrat umgesetzt wird.

Ziel war die Bestimmung des Hemmtyps und der Inhibitionskonstanten K_i (für kompetitive Hemmung) bzw. der Konstanten K_{ic} und K_{iu} , (für gemischte Hemmung). Je niedriger die Werte für die Inhibitionskonstanten sind, desto stärker bindet der Inhibitor an das Enzym und umso stärker ist auch die Hemmung des Enzyms (Ahlers, 1982). Um den Hemmtyp und die Konstanten zu bestimmen, wurden für jeden Inhibitor mehrere Messreihen aufgenommen. Dabei wurde die Konzentration des Substrates Ethylbenzol zwischen 47,5 µM und 970 µM variiert. Bei den Kontrollen ohne Inhibitor wurden die Substratkonzentrationen zwischen 1 µM und 952 µM variiert. Für jeden Inhibitor wurden bis zu sechs unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen zwischen 1 µM und 6500 µM gewählt. Auf dieser Basis wurden die Inhibitorkonzentrationen ermittelt, die zur graphischen Darstellung und Auswertung herangezogen werden konnten. Mit den erhaltenen Datenreihen wurden durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Graphikprogramms GraphPad Prism 4.00 zunächst Sättigungskurven gefittet. Anhand der Kurvenanpassung und des hyperbolen Verlaufs der Sättigungskurven war zu erkennen, dass diese alle der normalen Michaelis-Menten-Kinetik folgen (Gleichung 6).

Gleichung 6:
$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten-Gleichung})$$

Daraufhin wurden die Daten in doppelt-reziproken Lineweaver-Burk-Plots dargestellt, bei denen 1/v gegen 1/[S] aufgetragen wurde. Die Ausgleichsgeraden wurden dabei mit den Parametern aus

den nicht-linearen Kurvenanpassungen erstellt. Anhand der Lage des Schnittpunkts der einzelnen Kurven wurde entschieden, welcher Hemmtyp vorliegt. Bei der kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor ausschließlich an das Enzym, und nicht an den Enzym-Substrat-Komplex. Deshalb bleibt bei steigender Inhibitorkonzentration der V_{\max} -Wert unverändert, während der K_m -Wert größer wird. Schneiden sich die Kurven in den Lineweaver-Burk-Plots also auf der Ordinate, so handelt es sich um eine kompetitive Hemmung. Eine gemischte Hemmung liegt vor, wenn der Inhibitor sowohl an das Enzym, als auch an den Enzym-Substrat Komplex bindet und so bei steigender Inhibitorkonzentration V_{\max} kleiner und K_m größer wird. Liegt der Schnittpunkt der Kurven im zweiten Quadranten des Lineweaver-Burk-Graphen so enthält die Hemmung kompetitive und nicht-kompetitive Anteile. Im anderen Falle würden sich die Kurven im dritten Quadranten schneiden und die Hemmung nicht-kompetitive und unkompetitive Anteile enthalten (Ahlers, 1982). Um die Inhibitionskonstanten und damit auch den exakten Schnittpunkt der Inhibitionskurven bestimmen zu können, wurden die Daten mit dem Programm Leonora 1.0 (Cornish-Bowden, 1995) ausgewertet, das experimentelle Daten anhand der Gleichungen der „Steady-State“-Enzymkinetik bestmöglich zu vorgewählten Inhibitionsmodellen fittet. Zu jeder Inhibitionskinetik wurden so die ermittelten spezifischen Aktivitäten bei allen getesteten Inhibitor- und Substratkonzentrationen gegen die jeweiligen Gleichungen für kompetitive (Gleichung 1) und ge-mischte Inhibition (Gleichung 2) gefittet. Die einzelnen Inhibitionskonstanten (K_i für kompetitive Hemmung bzw. K_{ic} und K_{iu} für gemischte Hemmung) wurden so berechnet, ebenso die Konstanten V_{\max} und K_m der jeweiligen Inhibitionskinetiken. Die Mittelwerte von K_m und V_{\max} waren bei allen gemessenen Inhibitionskinetiken sehr ähnlich; über alle Messreihen ergaben sich gemittelte Werte von K_m zu $0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ und von V_{\max} zu $1,48 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$.

Sättigungskurven und Lineweaver-Burk-Plots der getesteten Inhibitionskinetiken sind nachfolgend dargestellt.

2.3.1. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Toluol

Zur Bestimmung der Inhibitionskinetik mit Toluol wurde in den Messreihen die Inhibitorkonzentrationen zwischen $0 \mu\text{M}$ und $2900 \mu\text{M}$ variiert. Mit steigender Inhibitorkonzentration bleibt V_{\max} konstant bei $1,07 \pm 0,32 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, wobei K_m von $0,8 \pm 0,39 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne Toluol auf $229 \pm 17 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit $2900 \mu\text{M}$ Toluol steigt (Abbildung 18). Das Substratanalogon Toluol ist also ein kompetitiver Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstante für kompetitive Hemmung K_i beträgt $3,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$.

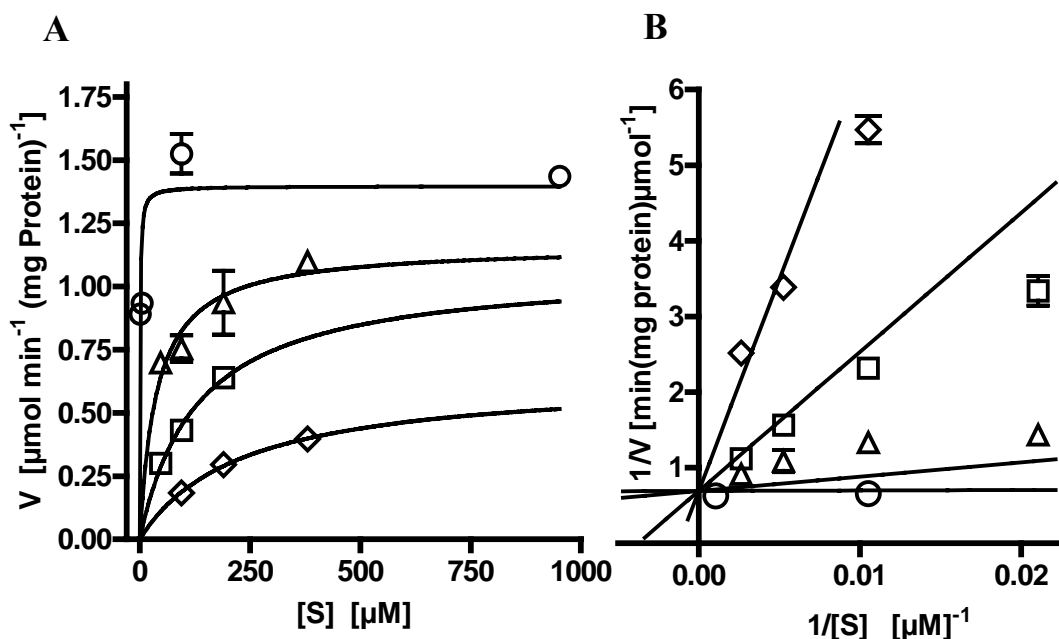


Abbildung 18: Sättigungskurven und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Toluol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 2900 μM Toluol (Rauten), 950 μM Toluol (Vierecke), 95 μM Toluol (Dreiecke) und 0 μM Toluol (Kreise). Folgende Konzentrationen des Substrats Ethylbenzol wurden eingesetzt: 1 μM , 5 μM , 47,5 μM , 95 μM , 190 μM , 380 μM und 952 μM .

2.3.2. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 1-(2-Naphtyl)ethanol

Um die Inhibitionskonstanten der Ethylbenzol Dehydrogenase-Hemmung durch 1-(2-Naphtyl)ethanol zu bestimmen, wurde in den Messreihen die Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 μM und 2900 μM variiert. Mit steigender Inhibitorkonzentration bleibt V_{\max} konstant bei $1,41 \pm 0,15 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, wobei K_m von $1,38 \pm 0,6 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne 1-(2-Naphtyl)ethanol auf $469 \pm 106 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit 2900 μM 1-(2-Naphtyl)ethanol steigt (Abbildung 19). Die alkoholische Verbindung 1-(2-Naphtyl)ethanol ist also ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstante für kompetitive Hemmung K_i beträgt $3,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

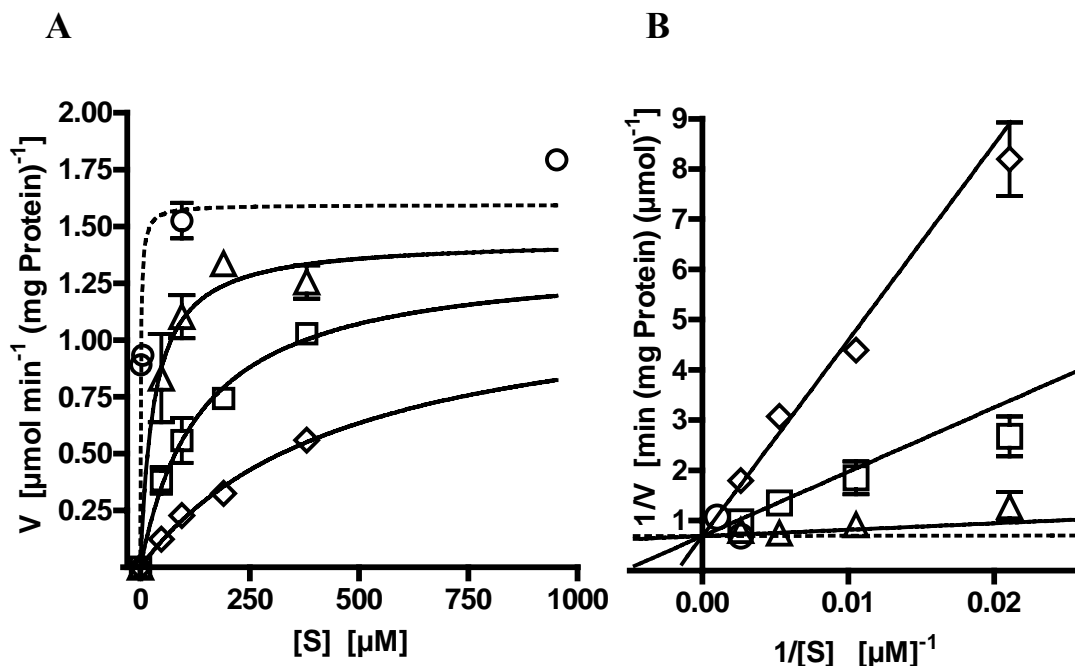


Abbildung 19: Sättigungskurven und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 1-(2-Naphtyl) ethanol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 2900 μM 1-(2-Naphtyl)ethanol (Rauten), 950 μM 1-(2-Naphtyl)- ethanol (Vierecke), 95 μM 1-(2-Naphtyl)ethanol (Dreiecke) und 0 μM 1-(2-Naphtyl)ethanol (Kreise, gestrichelte Linie).

2.3.3. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch (*S*)-1-Phenylethanol

Die Hemmkonstanten der Ethylbenzol Dehydrogenase-Inhibition durch (*S*)-1-Phenylethanol wurden bestimmt, indem die Inhibitorkonzentrationen in den Messreihen zwischen 0 μM und 6500 μM variiert wurden. Mit steigender Inhibitorkonzentration bleibt V_{max} konstant bei $1,13 \pm 0,25 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, wobei K_m von $0,56 \pm 0,26 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne (*S*)-1 Phenylethanol auf $115 \pm 21 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit 6500 μM (*S*)-1-Phenylethanol steigt (Abbildung 20). Das Reaktionsprodukt (*S*)-1-Phenylethanol ist also ein schwacher kompetitiver Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstante für kompetitive Hemmung K_i beträgt $12,7 \pm 7,3 \mu\text{M}$.

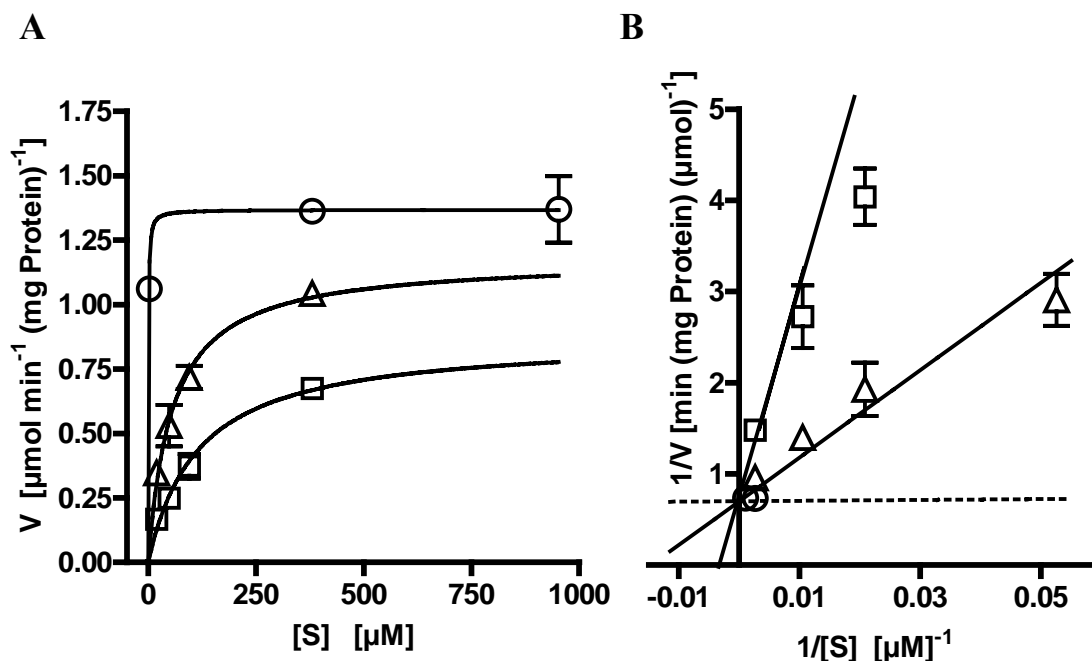


Abbildung 20: Sättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch (S)-1-Phenylethanol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 6500 μM (S)-1-Phenylethanol (Vierecke), 1300 μM (S)-1-Phenylethanol (Dreiecke) und 0 μM (S)-1-Phenylethanol (Kreise, gestrichelte Linie).

2.3.4. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 1,2-Diethylbenzol

Zur Bestimmung der Inhibitionskinetik wurde in den Messreihen die Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 μM und 285 μM variiert. Mit steigender Inhibitorkonzentration bleibt V_{max} konstant bei $1,27 \pm 0,36 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, wobei K_m von $0,83 \pm 0,19 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne 1,2 Diethylbenzol auf $165 \pm 74 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit 285 μM 1,2 Diethylbenzol steigt (Abbildung 21). Das Substratanalogon 1,2 Diethylbenzol ist ein kompetitiver Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstante für kompetitive Hemmung, K_i , beträgt $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

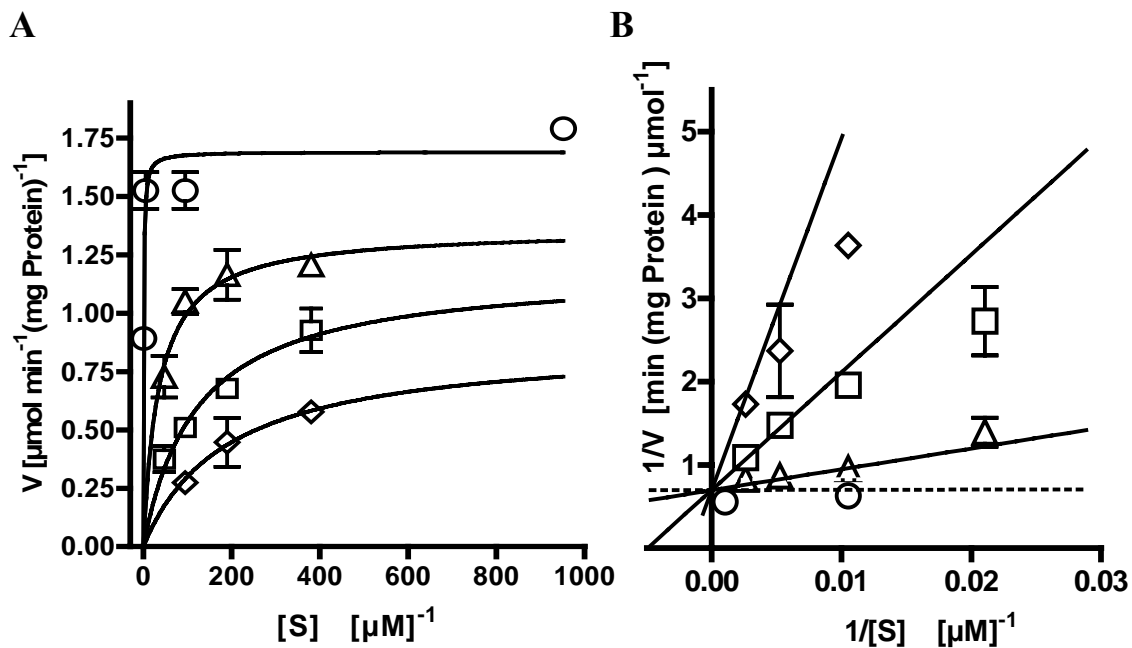


Abbildung 21: Sättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 1,2 Diethylbenzol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 285 μM (Raute), 95 μM (Vierecke), 10 μM (Dreiecke) und 0 μM 1,2 Diethylbenzol (Kreise, gestrichelte Linie).

2.3.5. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 2-Ethylthiophenol

Die Inhibitionskinetik der Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 2-Ethylthiophenol wurde bestimmt, indem in den Messreihen die Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 μM und 20 μM variiert. Mit steigender Inhibitorkonzentration sinkt V_{max} von $1,59 \pm 0,13 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ bei den Ansätzen ohne Inhibitor auf $0,54 \pm 0,09 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, bei den Ansätzen mit 20 μM Inhibitor (Abbildung 22). Dagegen steigt K_m von $0,83 \pm 0,19 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne 2-Ethylthiophenol auf $165 \pm 74 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit 20 μM 2-Ethylthiophenol. Das Substratanalogon 2-Ethylthiophenol ist also ein gemischter Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstanten der gemischten Hemmung betragen $0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (K_{ic}) und $18,6 \pm 6,6 \mu\text{M}$ (K_{iu}).

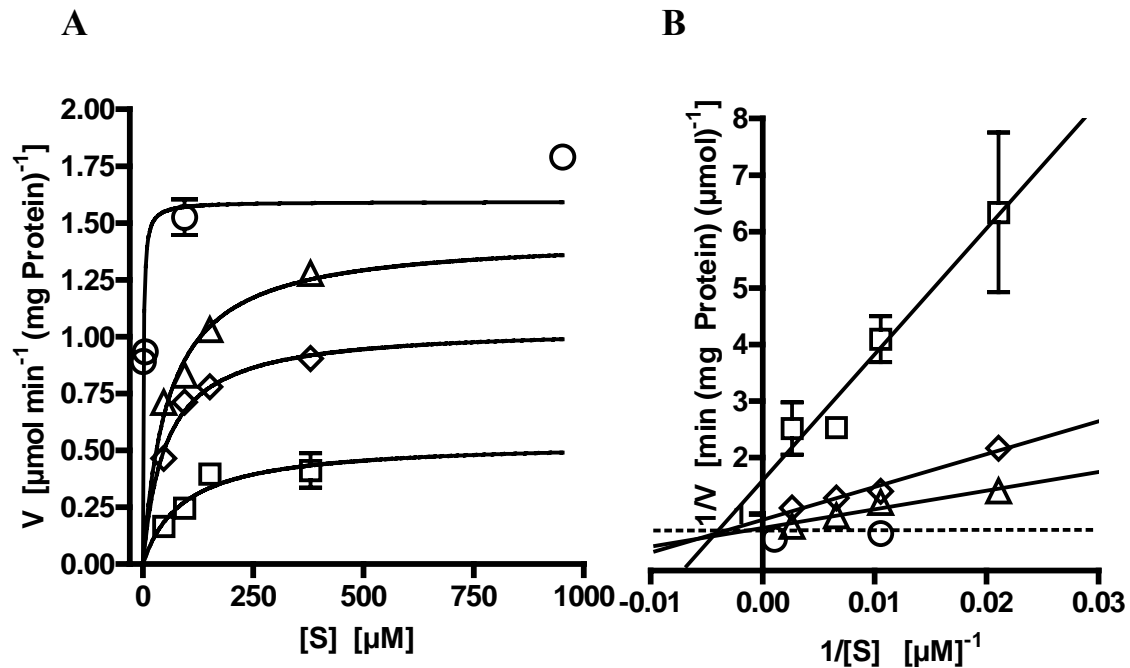


Abbildung 22: Sättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 2-Ethylthiophenol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 20 μM (Vierecke), 5 μM (Rauten), 1 μM (Dreiecke) und 0 μM 2-Ethylthiophenol (Kreise).

2.3.6. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 4-Ethylpyridin

Zur Bestimmung der Inhibitionskinetik wurde in den Messreihen die Inhibitor-Konzentrationen zwischen 0 μM und 5700 μM variiert. Mit steigender Inhibitor-Konzentration sinkt V_{max} von $1,59 \pm 0,13 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ bei den Ansätzen ohne Inhibitor auf $0,7 \pm 0,05 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, bei den Ansätzen mit 5700 μM Inhibitor (Abbildung 23). Dagegen steigt K_m von $1,37 \pm 0,61 \mu\text{M}$ bei den Ansätzen ohne 4-Ethylpyridin auf $166 \pm 27 \mu\text{M}$ bei Ansätzen mit 5700 μM 4-Ethylpyridin. Das Substratanalogon 4-Ethylpyridin ist ein gemischter Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstanten für gemischte Hemmung betragen $13,6 \pm 3,3 \mu\text{M}$ (K_{ic}) und $4095 \pm 931 \mu\text{M}$ (K_{iu}).

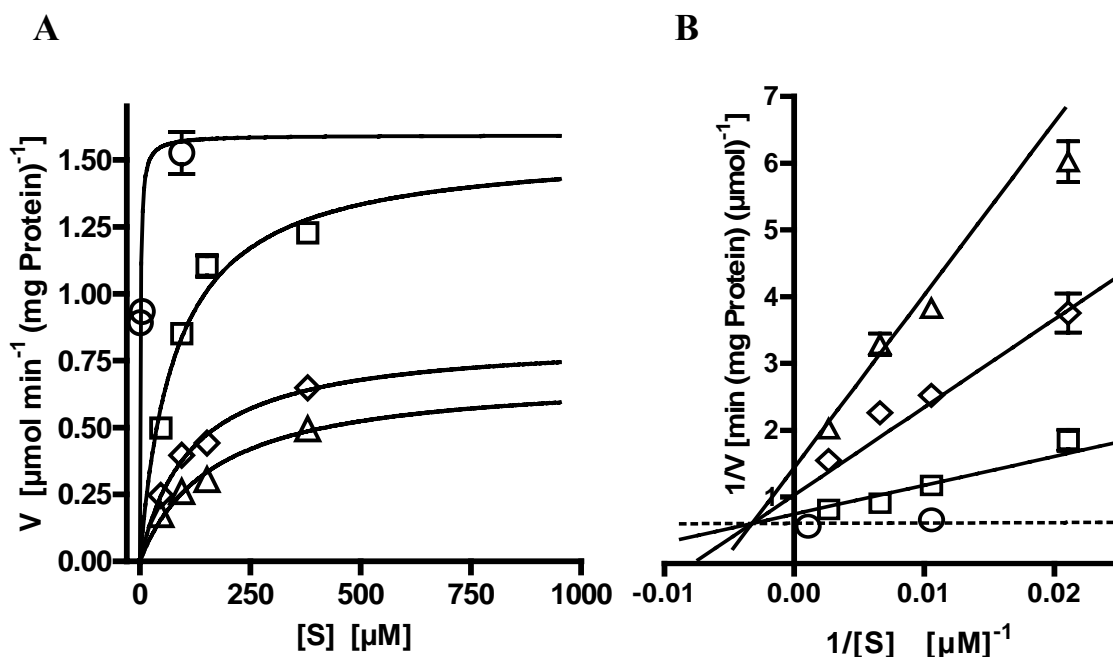


Abbildung 23: Sättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch 4-Ethylpyridin. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 5700 μM (Dreiecke), 2900 μM (Rauten), 950 μM (Vierecke), und 0 μM 4-Ethylpyridin (Kreise, gestrichelte Linie).

2.3.7. Hemmung der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Anisol

Um die Inhibitionskonstanten der Ethylbenzol Dehydrogenase während der Hemmung durch Anisol zu bestimmen wurde in den Messreihen die Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 μM und 240 μM variiert. Mit steigender Inhibitorkonzentration sinkt V_{max} von $1,59 \pm 0,13$ $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ bei den Ansätzen ohne Anisol auf $0,85 \pm 0,03$ $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, bei den Ansätzen mit 5700 μM Anisol (Abbildung 24). Dagegen steigt K_m von $1,37 \pm 0,61$ μM bei den Ansätzen ohne Anisol auf $119,2 \pm 11,9$ μM bei Ansätzen mit 5700 μM Anisol. Das Substratanalogon Anisol ist ein gemischter Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Inhibitionskonstanten für gemischte Hemmung betragen $0,9 \pm 0,1$ μM (K_{ic}) und 240 ± 33 μM (K_{iu}).

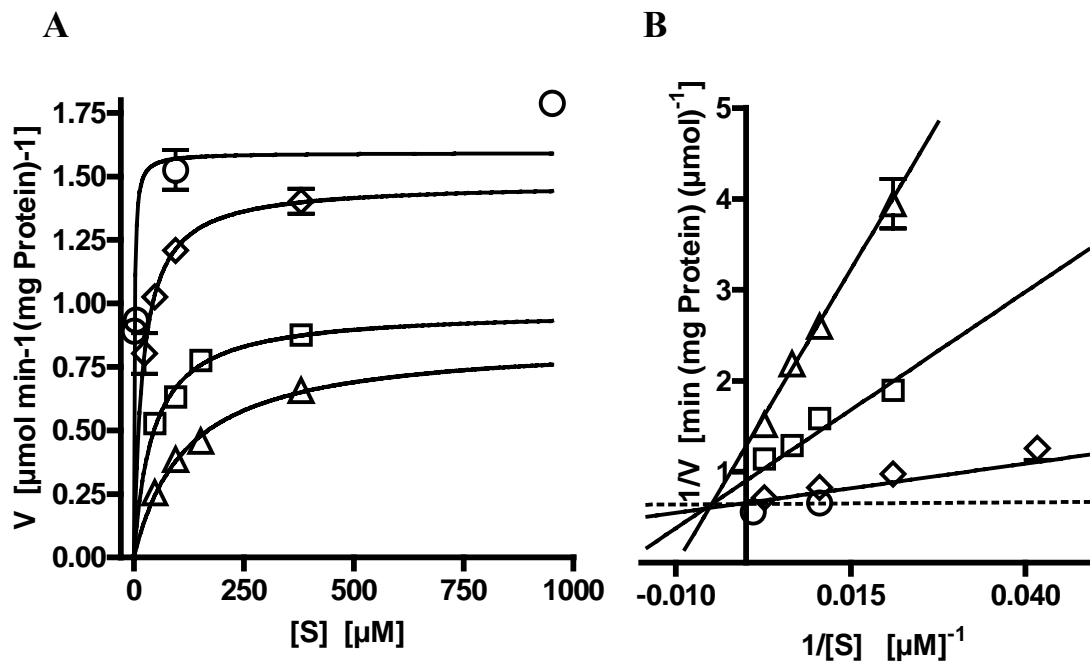


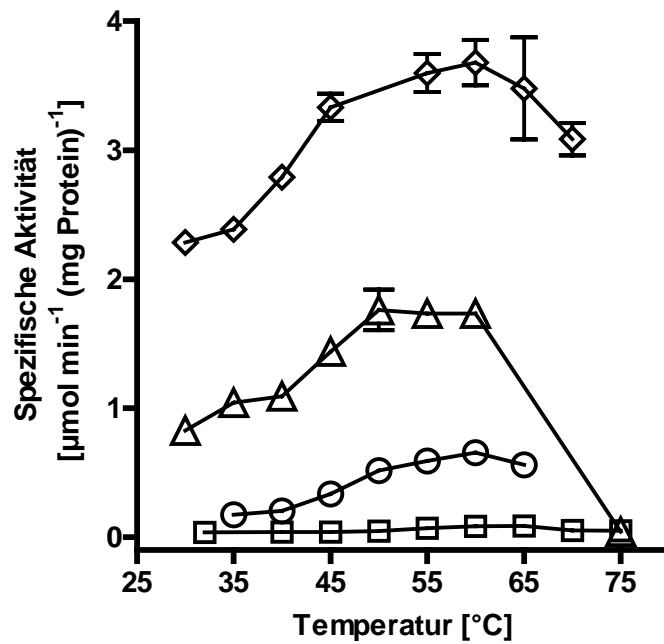
Abbildung 24: Sättigungskurve und Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Anisol. Gezeigt sind (A) Sättigungskurven und (B) Lineweaver-Burk-Plots der Inhibition durch 240 µM (Dreiecke), 95 µM (Vierecke), 19 µM (Rauten), und 0 µM Anisol (Kreise, gestrichelte Linie).

2.4. Temperaturabhängigkeit der Ethylbenzol Dehydrogenase

Während der kinetischen Studien der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde entdeckt, dass es sich bei der Ethylbenzol Dehydrogenase um ein moderat thermophiles Enzym handelt, wohingegen der Stamm EbN1 bei einer Optimumtemperatur von 30 °C wächst (M. Szaleniec, persönliche Mitteilung). Die Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde mit dem Substrat Ethylbenzol und den alternativen Substraten 4-Ethylphenol, 4-Ethylanisol und 2-Ethyltoluol zwischen 30 °C und 70 °C gemessen (Abbildung 25). Die maximale Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase lag für Ethylbenzol zwischen 50 °C und 60 °C und für 4-Ethylphenol, 2-Ethyltoluol, 4-Ethylanisol bei 60 °C. Diese Daten wurden aus dem exponentiell ansteigenden Teil der Kurven anhand der Arrhenius Gleichung (Gleichung 7) gefittet und zeigten für Ethylbenzol eine Aktivierungsenergie von $30,4 \pm 3,9$ kJ/mol, für 4-Ethylphenol $19,5 \pm 2,5$ kJ/mol, für 2-Ethyltoluol $52,4 \pm 6,6$ kJ/mol und für 4-Ethylanisol $45,6 \pm 4,8$ kJ/mol an.

Gleichung 7:
$$\ln k_{\text{cat}} = \frac{E_a}{R} + \ln A \quad (\text{Arrhenius Gleichung})$$

A



B

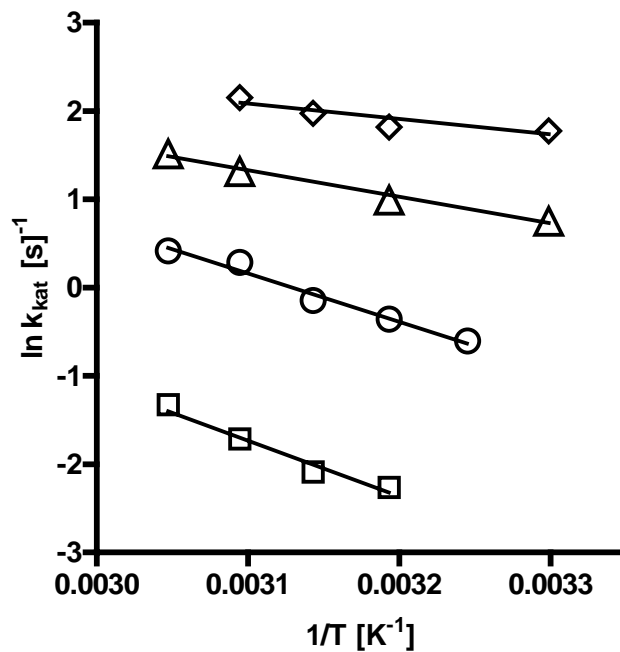


Abbildung 25: Temperaturabhängigkeit und Arrhenius Plot der Ethylbenzol Dehydrogenase. Gezeigt sind **A)** Temperaturabhängigkeit und **B)** Arrhenius Plots für 4-Ethylphenol (Raute), Ethylbenzol (Dreiecke), 4-Ethylanisol (Kreise) und 2-Ethyltoluol (Vierecke).

3. Spektroskopische Analyse der Ethylbenzol Dehydrogenase

Für die gesamte spektroskopische Analyse der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde das aerob gereinigte und ankonzentrierte Enzym ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) so eingesetzt, wie es nach der Reinigung aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 vorlag. Als letzter Chromatographieschritt wurde dabei ein zweiter Lauf über eine DEAE-Sepharose-Säule durchgeführt. Durch die routinemäßige Zugabe von Ferrizinium-Tetrafluorborat ($100 \text{ } \mu\text{M}$) in alle Laufpuffer während der Reinigung wurde das Enzym im oxidierten Zustand gehalten.

3.1. UV-Vis spektroskopische Analyse der nicht-inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase

Bereits in früheren UV-Vis spektroskopischen Studien der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde gezeigt, dass Reduktions- und Oxidationsmittel, wie Dithionit und Ferrizinium das UV-Vis Spektrum des Enzyms beeinflussen (Kniemeyer *et al.*, 2001a).

3.1.1. UV-Vis spektroskopische Analyse unter reduzierenden Bedingungen

Zur Aufnahme von UV-Vis Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase unter reduzierenden Bedingungen wurde das aerob gereinigte Enzym mit verschiedenen Konzentrationen von Dithionit ($0 \text{ } \mu\text{M}$ - $3160 \text{ } \mu\text{M}$) inkubiert (Abbildung 26). Da die Ethylbenzol Dehydrogenase einen Häm *b*-Kofaktor besitzt, lässt sich der Redox-Zustand des Enzyms leicht über UV-Vis Spektroskopie nachweisen. Bereits ab einer Konzentration von $125 \text{ } \mu\text{M}$ Dithionit wurde eine Verschiebung der Soretbande des Häm-Proteins von 414 nm auf 424 nm beobachtet. Charakteristisch für die Reduktion des Häm *b* ist das gleichzeitige Auftreten der Peaks bei 528 nm und 559 nm . Umso reduzierter der Redox-Zustand des Enzyms war, desto schmaler und kleiner wurde die Resonanz bei 424 nm . Die Eisen-Schwefel-Zentren des Enzyms, deren Resonanzen zwischen 420 und 500 nm auftreten, werden erst bei höheren Dithionit Konzentrationen (zwischen 1000 und $3160 \text{ } \mu\text{M}$) vollständig reduziert.

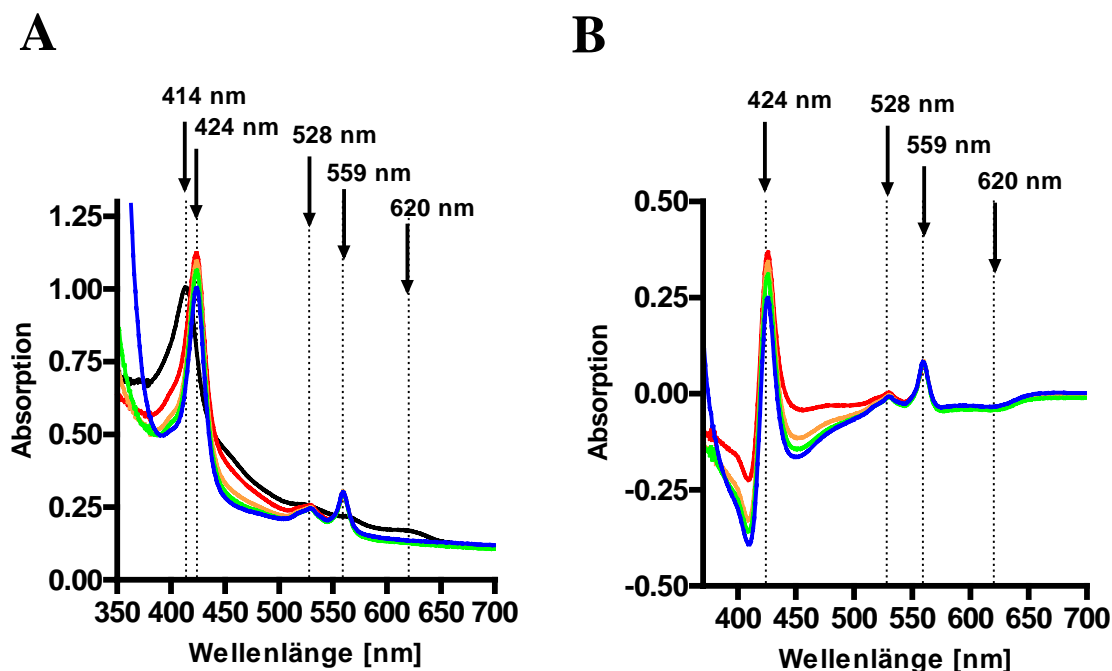


Abbildung 26: UV-Vis Spektrum der gereinigten Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Proben wurden mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 μM Ferrizinium Tetrafluorborat) hergestellt. Gezeigt sind (A) UV-Vis Spektren der gereinigten Ethylbenzol Dehydrogenase, welche mit verschiedenen Na-Dithionit Konzentrationen inkubiert wurden und (B) UV-Vis Differenzspektren reduzierter und oxidiert Ethylbenzol Dehydrogenase, wobei UV-Vis Spektrum des unbehandelten Enzyms wurde von dem Spektrum des mit 3160 μM Dithionit reduzierten Enzyms abgezogen. Spektren des unbehandelten Enzyms (schwarze Linie), nach Reduktion mit 125 μM Dithionit (rote Linie), 249 μM Dithionit (orange Linie), 372 μM Dithionit (grüne Linie) und 3160 μM Dithionit (blaue Linie). Reduktion des Häm *b*- Kofaktors wird durch die Verschiebung der Soretbande des Hämproteins (424 nm) und die Peaks bei 528 nm und 559 nm angezeigt. Im Bereich 420-500 nm befinden sich die Resonanzen der Fe-S-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase. Diese werden erst bei höheren Dithionit-Konzentrationen reduziert. Alle Spektren wurden gegen den jeweiligen Puffer aufgenommen.

3.1.2. UV-Vis spektroskopische Analyse unter oxidierenden Bedingungen

Um zu überprüfen, ob die gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase noch weiter oxidierbar ist, wurde das Enzym mit ansteigenden Ferrizinium-Tetrafluorborat-Konzentrationen (100 μM - 1 mM) inkubiert. Da dieses Oxidationsmittel sich nur bis zu einer Konzentration von ca. 300 μM in wässriger Lösung hält, wurde zunächst eine Ferrizinium-Tetrafluorborat-Stammlösung (100 mM) in dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Um eine Reaktion der Ethylbenzol Dehydrogenase mit DMSO auszuschließen, wurden zur Kontrolle zusätzlich UV-Vis Spektren aufgenommen, in welchen das Enzym gleichzeitig mit der entsprechenden Konzentration von DMSO inkubiert wurde. DMSO beeinflusste dabei das UV-Vis Spektrum nicht merklich (Abbildung 27).

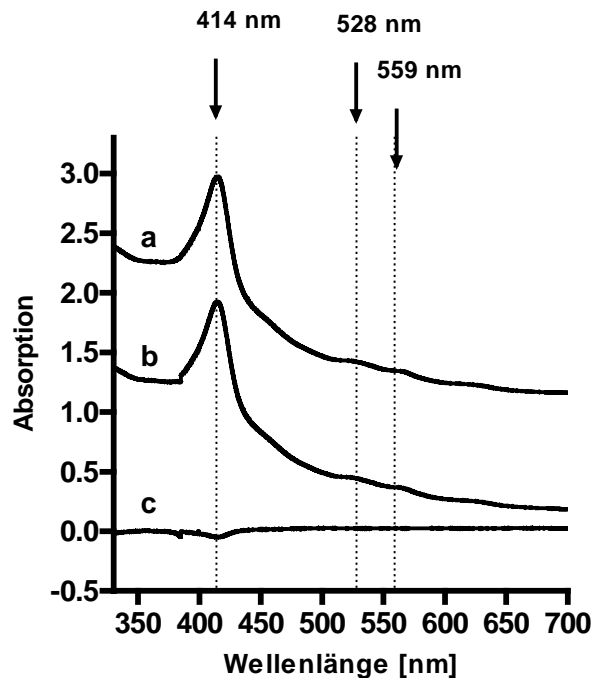


Abbildung 27: UV-Vis Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit DMSO. Gezeigt sind die UV-Vis Spektren der (a) unbehandelten, (b) mit 1 % DMSO behandelten Ethylbenzol Dehydrogenase und (c) das Differenzspektrum zwischen der unbehandelten und der mit 1 % DMSO behandelten Ethylbenzol Dehydrogenase. Das UV-Vis Spektrum des unbehandelten Enzyms wurde von dem Spektrum des mit 1 % DMSO behandelten Enzyms abgezogen. Um die UV-Vis Spektren besser unterscheiden zu können, wurde das Spektrum des unbehandelten Enzyms (Spektrum a) entlang der Abszisse um eine Absorptionseinheit nach oben verschoben. Alle Spektren wurden gegen den jeweiligen Puffer aufgenommen.

Die UV-Vis Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Oxidation mit Ferrizinium (0 mM - 1 mM) sind in Abbildung 28 gezeigt. Das Spektrum zeigte im Bereich der Soretbande des Häm *b* eine Verkleinerung des Peaks bei 414 nm, jedoch keine weitere Verschiebung in den Blaubereich des Spektrums. Im Gegensatz dazu nimmt die Absorption bei 414 nm bei der in dieser Arbeit durchgeführten Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des Häm *b* der Ethylbenzol Dehydrogenase mit steigendem Redoxpotential zu (Abbildung 50). Vermutlich ist die Verringerung dieser Absorption deshalb nicht auf eine weitere Oxidation der Ethylbenzol Dehydrogenase zurückzuführen. Man könnte vermuten, dass die hohe Konzentration des Oxidationsmittel Ferrizinium eine schädigende Wirkung auf den Häm *b*-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase hat. Des weiteren verringerte sich die Absorption zwischen 350 nm und 380 nm und bei 620 nm mit steigender Ferrizinium Konzentration, wobei es sich hierbei um Artefakte handelt, welche durch Subtraktion des Ferrizinium-haltigen Puffers zustande kamen. Die anderen charakteristischen Peaks des Hämproteins bei 528 nm und 559 nm verbleiben durch Inkubation mit Ferrizinium unverändert.

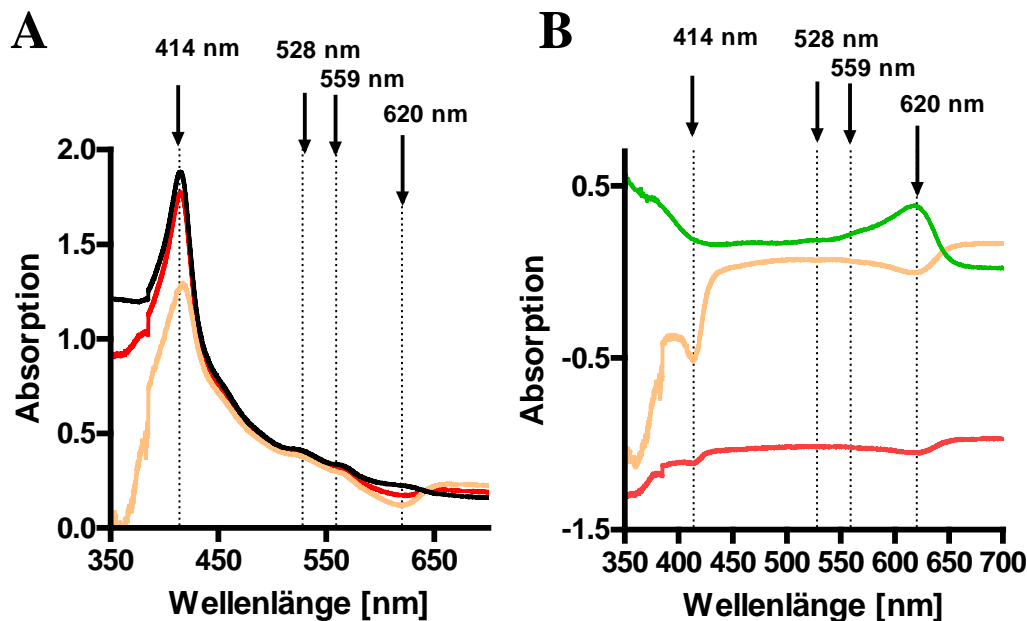


Abbildung 28: UV-Vis Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase unter Einwirkung von Ferrizinium. Die Proben wurden mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 µM Ferrizinium Tetrafluorborat, 0% - 1 % DMSO) hergestellt. **(A)** Gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase wurde mit verschiedenen Ferrizinium-Tetrafluorborat Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind die Spektren des unbehandelten Enzyms (schwarze Linie), nach Oxidation mit 300 µM Ferrizinium (rote Linie), nach Oxidation mit 1 mM Ferrizinium (orange Linie). **(B)** UV-Vis Differenzspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase, wobei das UV-Vis Spektrum des unbehandelten Enzyms wurde von dem Spektrum des mit 300 µM (rote Linie) und 1 mM (orange Linie) Ferrizinium oxidierten Enzyms abgezogen. Zum Vergleich ist ein Spektrum von 100 µM Ferrizinium Tetrafluorborat (grüne Linie) gezeigt, welches mit Faktor 10 multipliziert wurde. Alle Spektren wurden gegen den jeweiligen Puffer aufgenommen.

3.2. Elektronenspinresonanz-Analyse der nicht-inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase

Die Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase wurden mit Hilfe der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie genauer untersucht.

3.2.1. Elektronenspinresonanz-Analyse unter oxidierenden Bedingungen

Abbildung 29 zeigt ESR-Spektren des oxidierten Enzyms bei konstant geringer Mikrowellenleistung (0,1 mW) und unterschiedlichen Temperaturen. Bei niedriger Temperatur (6 K) zeigte das Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase Resonanzen bei $g = 2,027$, $g = 2,021$ und $g = 2,009$, die ein axiales Signal mit $g_x = 2,028$ und $g_{y/z} = 2,016$ bilden. Das Signal wird bereits bei Temperaturerhöhung auf 10 K kleiner (Abbildung 29b) und verschwindet ab einer Temperatur von 40 K (Abbildung 29c-e) vollständig. Das Verhalten dieses ESR-Signals ist typisch für

Signale von [3Fe-4S]-Zentren, welche nur im oxidierten Zustand ($[3\text{Fe-4S}]^{1+}$) ESR-aktiv sind und bereits bei 30-40 K relaxieren.

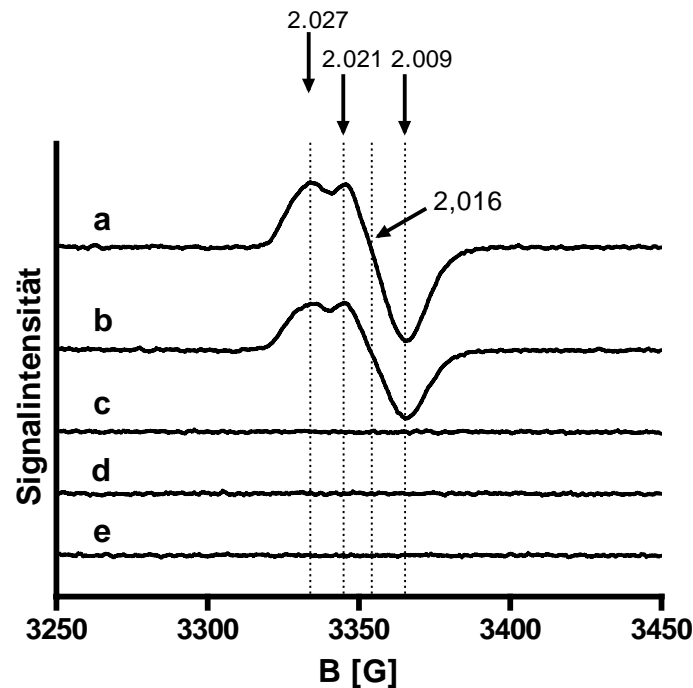


Abbildung 29: ESR-Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase unter oxidierenden Bedingungen und verschiedenen Temperaturen. Gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 μM Ferrizinium Tetrafluorborat) wurde bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Gezeigt sind die ESR- Spektren bei (a) 6 K, (b) 10 K, (c) 40 K, (d) 75 K, (e) 115 K. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 0,1 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Die Ethylbenzol Dehydrogenase besitzt einen Häm *b*-Kofaktor als prosthetische Gruppe (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Szaleniec *et al.*, 2003). Durch Häm-Aktivitätsfärbungen der Ethylbenzol Dehydrogenase war bereits bekannt, dass sich der Häm *b*-Kofaktor in der Gamma-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase befindet (Szaleniec *et al.*, 2003). Das verwandte Enzym Nitratreduktase NarGHI besitzt zwei Häm *b*-Kofaktoren in ihrer membranständigen NarI-Untereinheit (Bertero *et al.*, 2003). Diese beiden Häm-Kofaktoren, Häm b_L und Häm b_H , zeigen im oxidierten Enzym ESR-Signale bei g -Werten von $g=3,36$ und $g=3,76$ (Magalon *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001). Unter der Annahme, dass das ESR-Signal des Häm *b* der Ethylbenzol Dehydrogenase unter ähnlichen Bedingungen ESR-aktiv ist, wurden ESR-Spektren der gereinigten und ankonzentrierten Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) bei einer Temperatur von 10 K und 100 mW Mikrowellenleistung aufgenommen (Abbildung 30). Da Häm *b* nur unter oxidierenden Bedingungen ESR-aktiv ist, wurde zum Vergleich ein ESR-Spektrum mit gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase aufgenommen, die zuvor mit 6 mM Dithionit reduziert worden war. Das ESR-Differenzspektrum, bei welchem das ESR-Spektrum

des reduzierten Enzyms von dem Spektrum des unbehandelten Enzyms abgezogen wurde zeigt jedoch, dass die ESR-Spektren von reduzierter und oxidiertem Ethylbenzol Dehydrogenase im Bereich um $g = 3-4$ nahezu identisch sind.

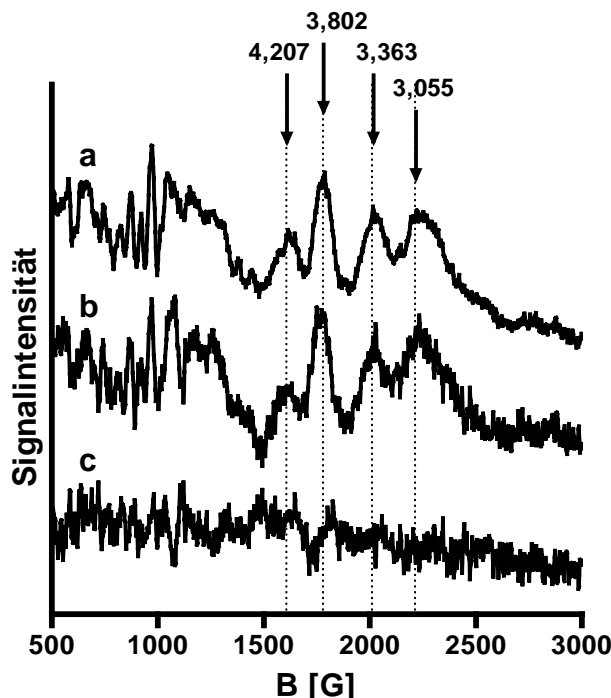


Abbildung 30: ESR-Spektren der gereinigten Ethylbenzol Dehydrogenase unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. Die Proben wurden mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 μM Ferrizinium Tetrafluorborat) hergestellt. Gezeigt sind die ESR Spektren des (a) unbehandelten Enzyms, (b) mit 6 mM Dithionit reduzierten Enzyms und (c) das Differenzspektrum des Enzyms, wobei das Spektrum des mit 6 mM Dithionit reduzierten Enzyms von dem des unbehandelten Enzyms abgezogen wurde. Das Spektrum b wurde nach den Amplituden der Eisen-Peaks bei $g \approx 11$ mit Faktor 1,8 multipliziert, um die Proteinkonzentration der Probe anzugleichen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 K Temperatur, 100 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 1 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Vermutlich war also das Redoxpotential in der oxidierten ESR-Probe nicht hoch genug, um den Häm *b*-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase oxidiert zu halten und so im ESR-Spektrum detektieren zu können. Deshalb wurde anschließend versucht, die Ethylbenzol Dehydrogenase noch weiter zu oxidieren.

3.2.2. Elektronenspinresonanz-Analyse nach Oxidation mit Ferrizinium

Die Reaktion der Ethylbenzol Dehydrogenase kann nur an Elektronenakzeptoren gekoppelt werden, die ein relativ hohes Redoxpotential besitzen, wie zum Beispiel das Ferrizinium-Ion (+380 mV), das als künstlicher Elektronenakzeptor dient (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Der Häm *b*-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase befindet sich am Ende der Elektronentransportkette

innerhalb des Enzyms in der Gamma-Untereinheit und transferiert die Elektronen wahrscheinlich auf den externen Elektronenakzeptor (Ergebnisse 1.3.). Deshalb wurde vermutet, dass das Mittelpunkt-Redoxpotential des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase dementsprechend hoch sein müsste. Da in der unbehandelten Ethylbenzol Dehydrogenase, die im oxidierten Zustand vorliegen sollte, kein ESR-Signal des Häm *b*-Kofaktors detektiert werden konnte (Ergebnisse 3.2.1.), wurde das Enzym mit ansteigenden Konzentrationen von Ferrizinium-Tetrafluorborat (0 mM – 1 mM) inkubiert. Die Proben für die ESR-Analyse wurden wie bereits unter Ergebnisse 3.1.2. beschrieben mit 1 % DMSO als Lösungsmittel für das Ferrizinium-Tetrafluorborat angesetzt. Um eine Reaktion der Ethylbenzol Dehydrogenase mit Dimethylsulfoxid (DMSO) auszuschließen, wurde durch Kontrollexperimente sichergestellt, dass DMSO keinen Einfluss auf das ESR-Spektrum hatte. Die ESR Spektren wurden bei konstanter Temperatur von 12 K und 20 mW Mikrowellenleistung aufgenommen (Abbildung 31).

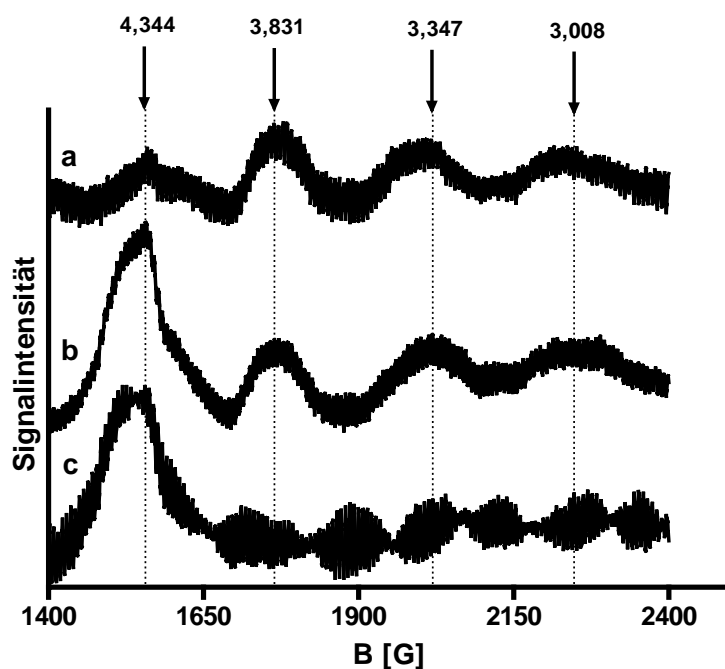


Abbildung 31: ESR-Spektren der oxidierten Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit dem Oxidationsmittel Ferrizinium. Die Proben wurden mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, $100 \text{ }\mu\text{M}$ Ferrizinium Tetrafluorborat, 1 % DMSO) hergestellt. Gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase wurde mit verschiedenen Ferrizinium-Tetrafluorborat Konzentrationen inkubiert. Gezeigt sind die ESR Spektren (a) des unbehandelten Enzyms, (b) nach Inkubation mit 1 mM Ferrizinium und (c) das Differenzspektrum zwischen Spektrum a) und b), wobei Spektrum a) von Spektrum b) angezogen wurde. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 12 K Temperatur, 20 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 2 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Bei einem g-Wert von $g = 4,344$ wurde ein Signal detektiert, dass mit steigender Konzentration des Elektronenakzeptors Ferrizinium um das Neunfache zunimmt, wobei dieses Signal vermutlich auf freies oxidiertes Eisen der jeweiligen Probe zurückzuführen ist, welches mit dem

Ferrizinium in die Probe eingebracht wurde. Ansonsten wurde durch die Inkubation der Ethylbenzol Dehydrogenase mit 1 mM Ferrizinium keine signifikante Änderung des ESR-Spektrums erreicht. Vermutlich reicht die in diesem Experiment verwendete Ferrizinium Konzentration nicht aus, um die Ethylbenzol Dehydrogenase bei der für diese Technik notwendigen hohen Konzentration in einen noch oxidierten Zustand zu versetzen. Alternativ kann man jedoch nicht ausschließen, dass das ESR-Spektrum des Häm *b*-Kofaktors in einem völlig anderen Bereich des Spektrums liegt.

3.2.3. Elektronenspinresonanz Analyse unter reduzierenden Bedingungen

Aerob gereinigte und ankonzentrierte Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) wurde mit 6 mM Dithionit reduziert. Das Enzym zeigte bei niedriger Temperatur (10 K) komplexe Signale mit *g*-Werten bei $g = 2,072$, $g = 1,951$, $g = 1,886$ und $g = 1,908$ (Abbildung 32). Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 13 K werden diese Signale kleiner und verschwinden ab einer Temperatur von 40 K komplett.

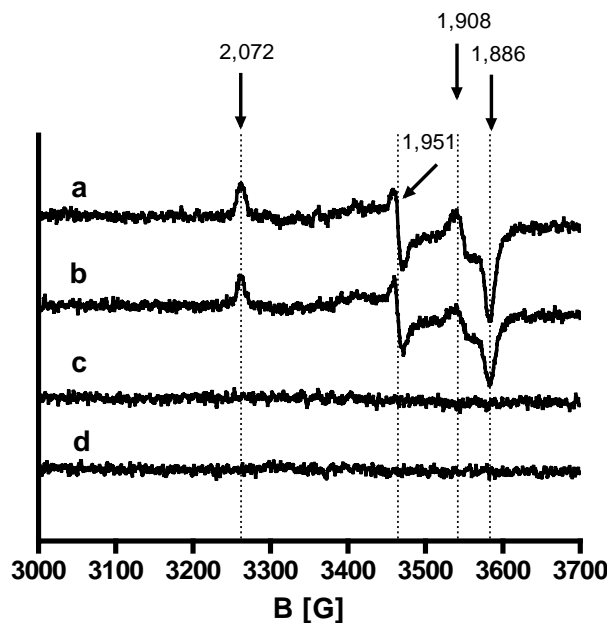


Abbildung 32: ESR Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase unter reduzierenden Bedingungen und verschiedenen Temperaturen. Die Proben wurden mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase ($1,9 \text{ mg ml}^{-1}$) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 μM Ferrizinium Tetrafluorborat) hergestellt und mit 6 mM Dithionit reduziert. Gezeigt sind die ESR- Spektren **(a)** bei 10 K, 5 mW, **(b)** bei 13 K, 5 mW, **(c)** bei 40 K, 2 mW und **(d)** bei 100 K, 10 mW. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude.

Diese ESR-Signale sind typisch für Signale von [4Fe-4S]-Zentren, welche die Eigenschaft besitzen, dass sie nur unter reduzierenden Bedingungen zu beobachten sind (ESR-Aktivität der

[4Fe-4S]¹⁺-Form), eine rhombische Gestalt besitzen und bei hohen Temperaturen vollständig verschwinden.

3.3. Spektroskopische Analyse der inhibierten Ethylbenzol Dehydrogenase

Niedermolekulare Verbindungen wie Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid inhibieren die Enzymaktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Ergebnisse 2.2.3 und 2.2.4.). Der Häm *b*-Kofaktor des Enzyms reagiert vermutlich mit Luftsauerstoff und bildet im reduzierten Zustand reaktive Intermediate, wie Superoxid oder Wasserstoffperoxid, die das Enzym schädigen würden. Um zu analysieren, wie sich die Inhibition der Ethylbenzol Dehydrogenase durch Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid auf die Kofaktoren des Enzyms auswirkt, wurden die Auswirkungen der Inhibitoren auf die spektroskopischen Eigenschaften der Ethylbenzol Dehydrogenase genauer studiert.

3.3.1. Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das UV-Vis Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase.

Zur Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffperoxid auf das UV-Vis Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde das Enzym für fünf Minuten mit verschiedenen Wasserstoffperoxid Konzentrationen (0 - 60 mM) inkubiert. Die UV-Vis Spektren zeigen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid eine minimale Absorptionsabnahme vor allem im Absorptionsbereich der Soretbande (414 nm) des Häm *b*-Kofaktors und im Bereich der Eisen-Schwefel-Zentren (zwischen 400-500 nm) (Abbildung 33). Diese Absorptionsverringering deutet vermutlich auf eine Schädigung des Häm *b*-Kofaktors hin und wäre damit ein Grund warum die Ethylbenzol Dehydrogenase durch Wasserstoffperoxid inaktiviert wird (Ergebnisse 2.2.3.).

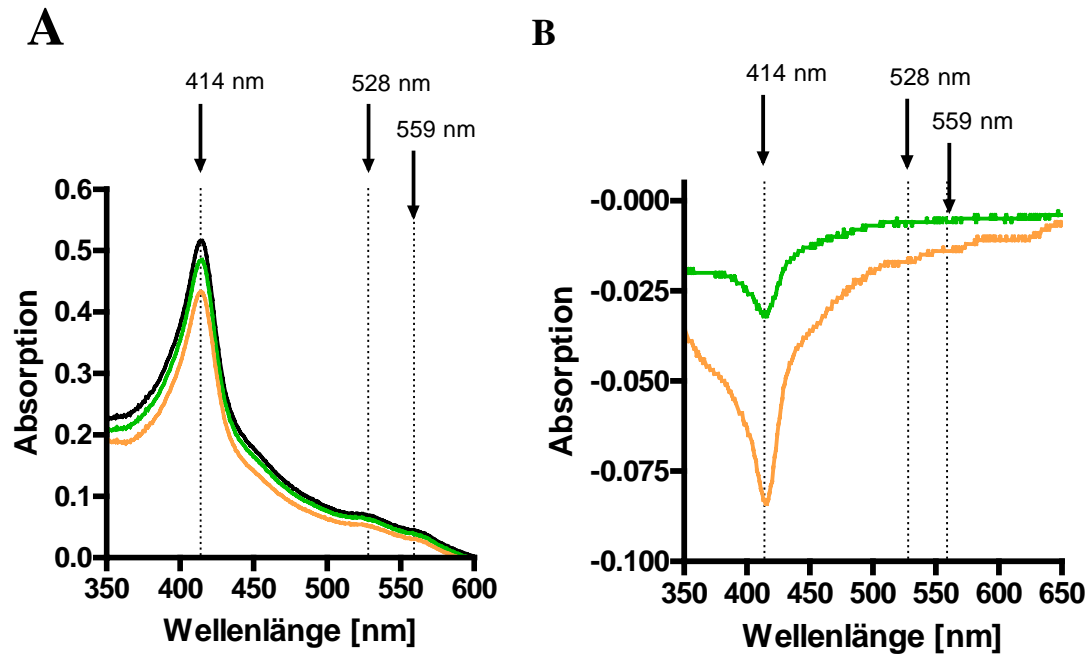


Abbildung 33: UV-Vis Differenzspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid. (A) Gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase wurde mit verschiedenen Wasserstoffperoxid Konzentrationen (0 mM bis 15 mM) inkubiert. Gezeigt sind die UV-Vis Spektren des unbehandelten Enzyms (schwarze Linie), nach Inkubation mit 15 mM (grüne Linie), nach Inkubation mit 60 mM Wasserstoffperoxid (orange Linie). (B) UV-Vis Differenzspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase. Das Spektrum der unbehandelten Ethylbenzol Dehydrogenase wurde von dem Spektrum, des mit 15 mM (grüne Linie) und 60 mM (orange Linie) Wasserstoffperoxid behandelten Enzyms subtrahiert. Die Probe wurde mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase (1,9 mg ml⁻¹) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 µM Ferrizinium Tetrafluorborat) hergestellt und wurde mit 60 mM Wasserstoffperoxid für 5 Minuten inkubiert.

3.3.2. Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase

Nach Inkubation der Ethylbenzol Dehydrogenase mit 60 mM Wasserstoffperoxid für fünf Minuten wurde bei einer konstanter Mikrowellenleistung von 10 mW und einer Temperatur von 10 K ein Signal detektiert, dass im Vergleich zu dem Signal des unbehandelten Enzyms geringfügig nach links verschoben ist, keinen Peak bei einem g-Wert von $g = 2,021$ aufweist und insgesamt kleiner erscheint (Abbildung 34 a-b).

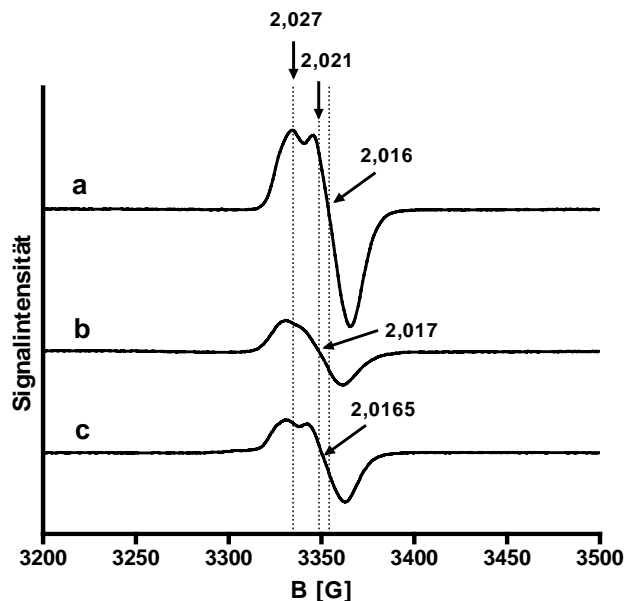


Abbildung 34: ESR Spektren der gereinigten Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid. Die ESR-Spektren zeigen (a) das unbehandelte Enzym, (b) nach Inkubation mit 60 mM H_2O_2 und (c) nach Inkubation mit 0,5 mM NO. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 mW Mikrowellenleistung, 10 K Temperatur, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Dieses ESR-Signal verschwindet genauso wie das Signal des unbehandelten Enzyms bei höheren Temperaturen ab 40 K (Abbildung 35) und ist vermutlich das Signal eines $[3Fe-4S]$ -Zentrums, das durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid beschädigt wurde und deshalb die Resonanz bei $g = 2,021$ verloren hat.

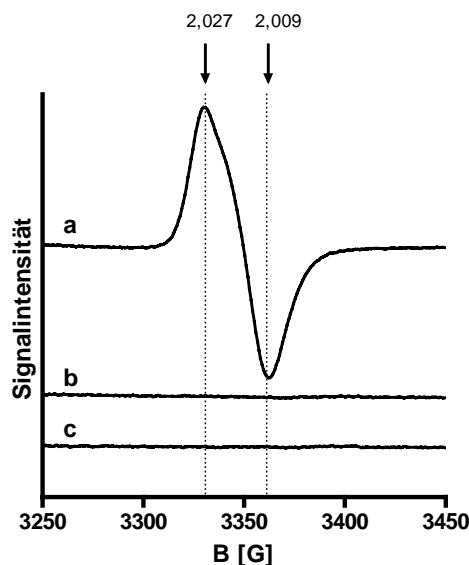


Abbildung 35: Temperaturabhängigkeit des ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Die ESR-Spektren wurden bei einer Temperatur von (a) 10 K, (b) 40 K und (c) 120 K gemessen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 100 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

3.3.3. Einfluss von Stickstoffmonoxid auf das UV-Vis Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase

Um den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf das UV-Vis Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase zu untersuchen, wurde das oxidierte Enzym (26 μM) dazu direkt vor der spektroskopischen Untersuchung mit 0,5 mM gelöstem Stickstoffmonoxid in wässriger Phase für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das UV-Vis Spektrum zeigt nach Behandlung mit Stickstoffmonoxid eine minimale Absorptionsabnahme im Absorptionsbereich der Soretbande (414 nm) des Häm Kofaktors, und eine Zunahme anderer charakteristischer Hämprotein-Peaks bei 528 nm und 559 nm und der Resonanzen der Fe-S Zentren (420–500 nm), die Gestalt des Signals ändert sich jedoch nicht wesentlich (Abbildung 36). NO hat vermutlich einen geringen Einfluss auf die Fe-S- Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase. Um jedoch noch exaktere Aussagen über den Einfluss von NO auf die Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase zu erhalten, wurde im Folgenden auch das ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit NO studiert.

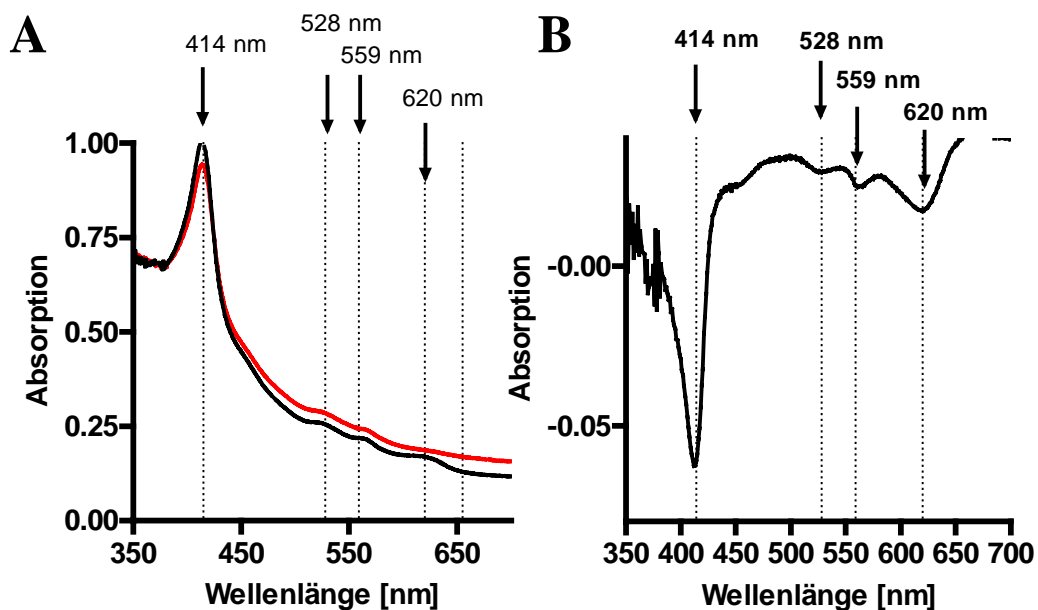


Abbildung 36: UV-Vis Differenzspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Stickstoffmonoxid. (A) Gereinigte Ethylbenzol Dehydrogenase wurde mit 0,5 mM Stickstoffmonoxid inkubiert. Gezeigt sind die UV-Vis Spektren des unbehandelten Enzyms (schwarze Linie) und nach Inkubation mit 0,5 mM NO (rote Linie). (B) UV-Vis Differenzspektrum zwischen der unbehandelten und NO-behandelten Ethylbenzol Dehydrogenase. Das Spektrum der unbehandelten Ethylbenzol Dehydrogenase wurde von dem Spektrum, des mit 0,5 mM Stickstoffmonoxid behandelten Enzyms subtrahiert. Die Probe wurde mit gereinigter Ethylbenzol Dehydrogenase (1,9 mg ml⁻¹) in Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 % Glycerin, 100 μM Ferrizinium Tetrafluorborat) hergestellt und wurde mit 0,5 mM Stickstoffmonoxid für 5 Minuten inkubiert.

3.3.4. Einfluss von Stickstoffmonoxid auf das ESR-Spektrum der Ethylbenzol

Dehydrogenase

Die Ethylbenzol Dehydrogenase wurde vor der Analyse des ESR-Spektrums für fünf Minuten mit 0,5 mM Stickstoffmonoxid bei 20 °C inkubiert. Das ESR-Spektrum hat die gleiche Gestalt wie das Signal des unbehandelten Enzyms, ist jedoch bei einer Temperatur von 10 K und einer Mikrowellenleistung von 10 mW insgesamt kleiner (Abbildung 34 c). Wie bereits bei dem ESR-Signal der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid beobachtet werden konnte, ist auch das Signal des Stickstoffmonoxid-behandelten Enzyms geringfügig nach links verschoben. Dieses ESR-Signal mit g -Werten bei $g = 2,028$, $g = 2,021$ und $g = 2,009$ verschwindet bei höheren Temperaturen (40 K- 120 K) vollständig, wie es auch bei dem [3Fe-4S]-Signal des unbehandelten Enzyms der Fall war (Abbildung 29). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die insgesamt kleinere Gestalt des [3Fe-4S]-Signal einen möglichen Einfluss von NO auf dieses Eisen-Schwefel-Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase indiziert, der sich aber (anders als bei Wasserstoffperoxid) nicht auf die Gestalt des Spektrums auswirkt.

Betrachtet man das ESR-Signal des Stickstoffmonoxid-behandelten Enzyms bei einer geringeren Mikrowellenleistung von 0,1 mW, so erscheint ein zusätzlicher Peak bei $g = 2,041$, der auch bei höheren Temperaturen nicht wieder verschwindet (Abbildung 37 und Abbildung 38). Diese neu auftretende Resonanz bei $g = 2,041$ ist also weit temperaturresistenter als die Resonanzen des [3Fe-4S]-Zentrums und wird somit vermutlich von einer anderen Kofaktor-Spezies der Ethylbenzol Dehydrogenase ausgelöst. Eine Möglichkeit wäre dabei der Molybdän Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase. Ein Charakteristikum für Signale von Molybdän sind, dass sie nur im Mo(V)-Redox-Zustand ESR-aktiv sind (Brondino *et al.*, 2004). Des weiteren können sie innerhalb eines großen Temperaturbereiches (10 K-120 K) detektiert werden. Um das neue ESR-Signal genauer zu studieren, wurden die NO-behandelten ESR-Proben des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen (10 K-120 K) und verschiedenen Mikrowellenleistungen (0,1 mW und 100 mW) gemessen (Abbildung 38). Bereits ab einer Temperatur von 40 K erscheint dabei ein komplett neues Signal mit Peaks bei $g = 2,041$, $g = 2,024$ und $g = 2,016$, das bei einer Temperatur von 10 K teilweise noch durch das ESR-Signal des postulierten [3Fe-4S]-Zentrums verdeckt wurde.

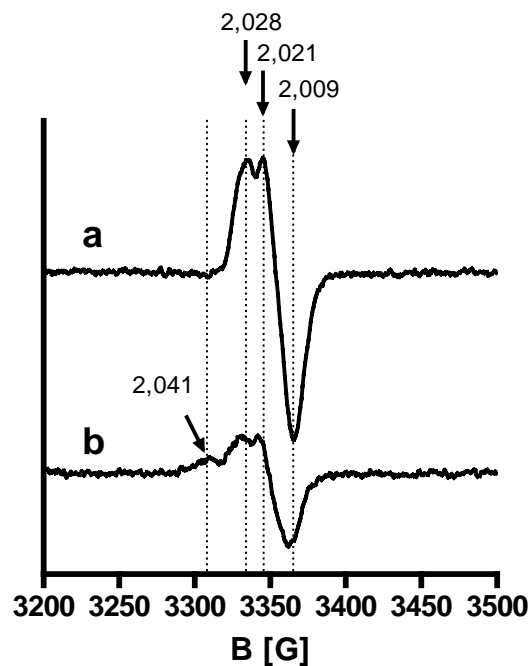


Abbildung 37: ESR Spektren der gereinigten Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit NO. Die ESR-Spektren zeigen (a) das unbehandelte Enzym, (b) nach Inkubation mit 0,5 mM NO. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 0,1 mW, 10 K, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Die Amplitude der Resonanz bei $g=2,041$ ist bei einer Mikrowellenleistung von 100 mW ab 40 K gesättigt (Abbildung 39). Das könnte darauf hindeuten, dass es sich vielleicht vermutlich auch um Signale von [2Fe-2S]-Zentren handeln könnte, welche typischerweise bei diesen Temperaturen noch detektierbar sind (Gayda *et al.*, 1976).

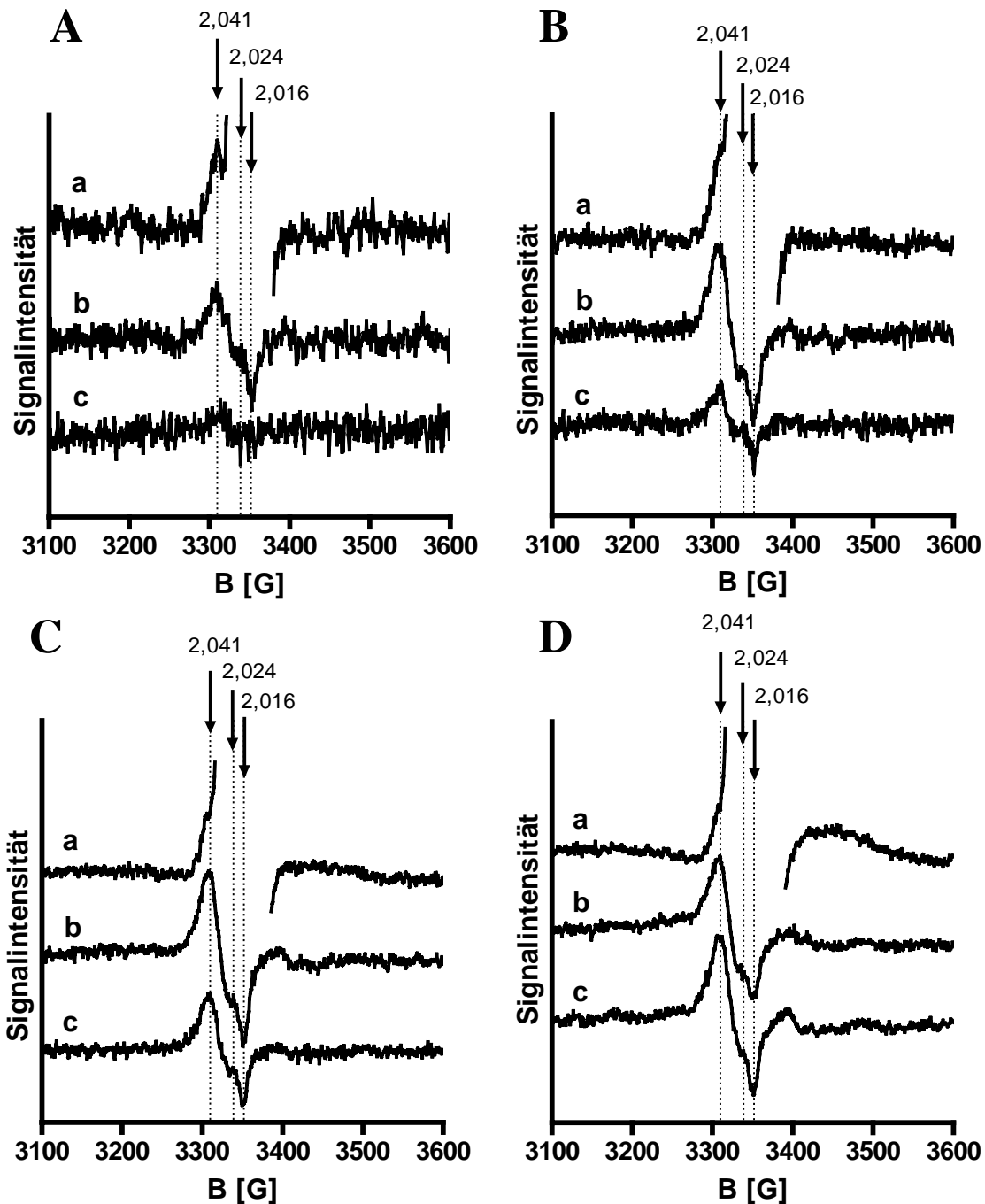


Abbildung 38: ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Stickstoffmonoxid in Abhängigkeit der Mikrowellenleistungen und Temperatur. Die Ethylbenzol Dehydrogenase wurde mit 0,5 mM NO für 5 min inkubiert. Gezeigt sind ESR-Spektren bei einer Mikrowellenleistung von (A) 0,1 mW, (B) 1 mW, (C) 10 mW, (D) 100 mW. Die Spektren wurden jeweils bei (a) 10 K, (b) 40 K und (c) 120 K aufgenommen. Um die ESR-Spektren bei einer Temperatur von 10 K (Spektren (a)) entsprechend darzustellen, wurde das Signal des [3Fe-4S]-Zentrums (im Bereich zwischen $g \approx 2,03$ und 2,00) abgeschnitten. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

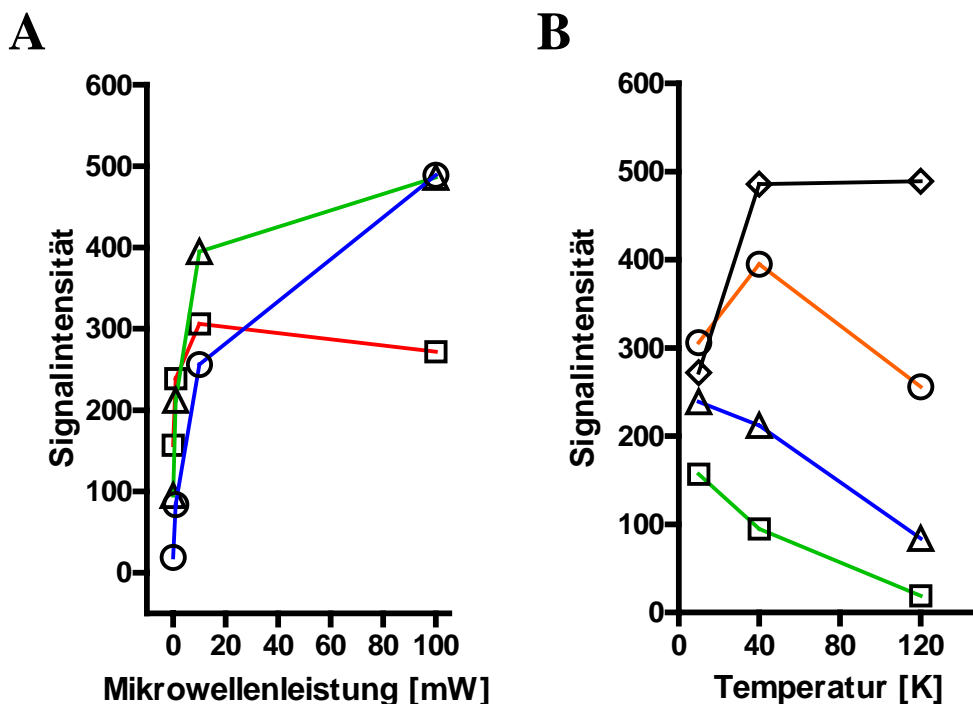


Abbildung 39: Abhängigkeit des ESR-Signals der Ethylbenzol Dehydrogenase nach Inkubation mit Stickstoffmonoxid von der Mikrowellenleistung und der Temperatur. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Signalintensität des ESR-Peaks bei einem g -Wert von $g = 2,041$. Zur Probenherstellung wurde die Ethylbenzol Dehydrogenase mit 0,5 mM NO für 5 min inkubiert. Die Graphen zeigen die Abhängigkeit der Signalintensität von folgenden Parametern: **(A)** Abhängigkeit von der Mikrowellenleistung. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 10 K (rote Linie, Vierecke), 40 K (grüne Linie, Dreiecke) und 120 K (blaue Linie, Kreise) gemessen. **(B)** Abhängigkeit der Temperatur. Die Proben wurden bei der Mikrowellenleistung von 0,1 mW (grüne Linie, Vierecke), 1 mW (blaue Linie, Dreiecke), 10 mW (rote Linie, Kreise) und 100 mW (schwarze Linie, Raute) gemessen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

4. Redoxtitration der Ethylbenzol Dehydrogenase

Um die Mittelpunkt-Redoxpotentiale der Redoxzentren der Ethylbenzol Dehydrogenase zu bestimmen, wurde eine Redoxtitration mit gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) durchgeführt. Dazu wurde die Enzymlösung mit verschiedenen Mediatorsubstanzen mit definierten Redoxpotentialen versetzt, die bei Einstellung des Potentials als Vermittler zwischen den redoxaktiven Gruppen des Enzyms und dem Reduktionsmittel in der Lösung dienen (Material und Methoden, Tabelle 23). Die Titration wurde bei 25 °C und anaeroben Bedingungen unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Die Proben wurden innerhalb eines Potentialbereiches zwischen +219 mV und -374 mV gegen die Standardwasserelektrode (NHE) entnommen, wobei das Enzym mit einer gesättigten Dithionit-Lösung schrittweise in ca. 50 mV Schritten reduziert wurde. Die Proben wurden anschließend durch eine

Elektronenspinresonanz (ESR)-Analyse untersucht. Danach wurde mit Hilfe eines Graphikprogramms (Prism 4.00, GraphPad, San Diego, Kanada) die Signalamplitude der ESR-Signale der jeweiligen Redoxzentren als Funktion des entsprechenden Redoxpotential (vs. NHE) aufgetragen. Die Mittelpunkt-Redoxpotentiale der Redoxzentren wurden bestimmt, indem die Auftragungen gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 1) gefittet wurden. Der Wendepunkt der Kurve gibt jeweils das Mittelpunkt-Redoxpotential an.

Gleichung 7:
$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} \quad (\text{Nernst-Gleichung})$$

E (Elektrodenpotential), E° (Mittenpotential), R (Universelle Gaskonstante), T (absolute Temperatur), n (Anzahl der übertragenen Elektronen), F (Faraday-Konstante), [ox] bzw. [red] (Konzentration des betreffenden Redoxpartners).

Alle in Frage kommenden Redoxzentren der Ethylbenzol Dehydrogenase sind Ein-Elektronen-Überträger. Bei Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung lagen die Korrelationskoeffizienten der erhaltenen Nernst-Plots auch tatsächlich stets bei über 99 %. Zu allen untersuchten Redoxübergängen wurden jedoch zusätzlich auch Nernst-Plots gefittet, bei denen als Anzahl der übertragenen Elektronen zwei angenommen wurde. Diese waren für alle beobachteten Redoxzentren wesentlich schlechter als für Ein-Elektronen-Übergänge.

4.1. Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase

Bei den Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase handelt es sich um schnell relaxierende Spin-Systeme (Ergebnisse 3.2.1. und 3.2.3.). Bei höheren Temperaturen als 40 K verbreitern sich die Signale und verschwinden in der Basislinie. Ein [3Fe-4S]-Zentrum war nur im oxidierten Zustand, mehrere [4Fe-4S]-Zentren waren nur im reduzierten Zustand des Enzyms zu beobachten. Bei niedrigen Temperaturen besteht das ESR-Spektrum der oxidierten Ethylbenzol Dehydrogenase aus einem typischen $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Signal in der $g \approx 2,02$ Region welches bei Redoxpotentialen positiver als + 165 mV vollständig ausgebildet war (Abbildung 40).

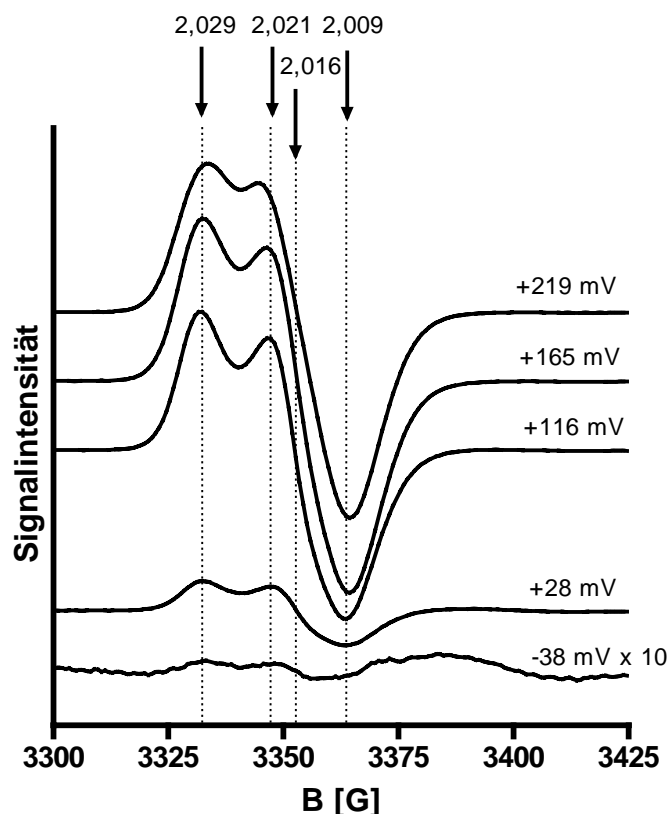


Abbildung 40: ESR-Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase im Bereich um $g \approx 2,0$ bei verschiedenen Redoxpotentialen von +219 mV bis -38 mV. Die Potentiale gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden durch Zugabe von Dithionit in Anwesenheit von Redoxmediatoren eingestellt. Die Spektren wurden bei 12 K aufgenommen. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Alle Spektren wurden unter nicht-gesättigten Bedingungen aufgenommen. Um die Resonanzen des ESR-Spektrums bei -38 mV zu verdeutlichen, wurde dieses mit Faktor 10 multipliziert dargestellt. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Weitere Reduktion des Enzyms durch Natrium-Dithionit führte zum Verschwinden des $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Signals und Erscheinen neuer Signal-Spezies (Abbildung 40 und Abbildung 41). Die Änderungen der Resonanzen dieser ESR-Spektren wurden in zwei Schritten verfolgt.

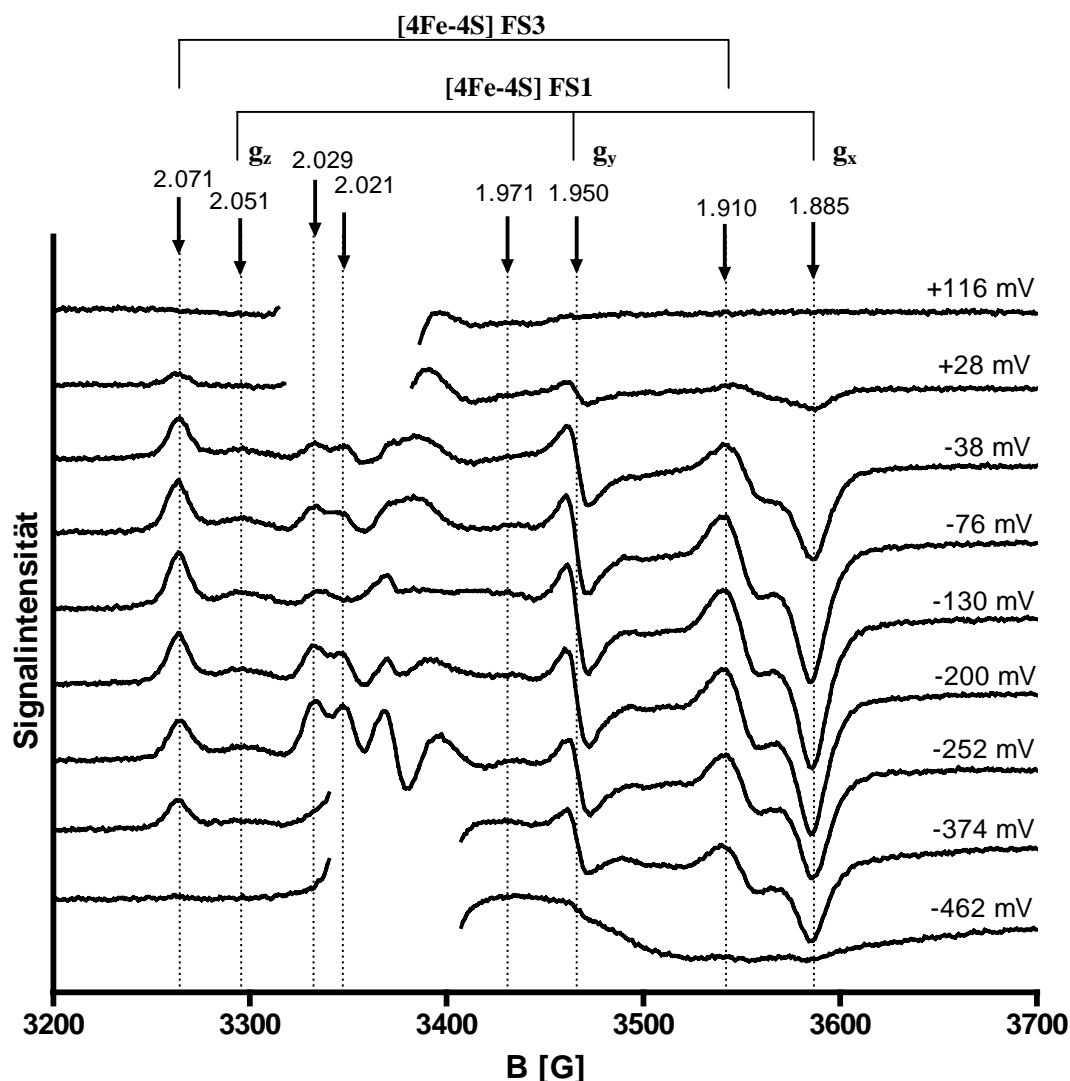


Abbildung 41: ESR-Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase im Bereich um $g \approx 2,0$ bei verschiedenen Redoxpotentialen von + 116 mV bis –462 mV (gegen NHE). Die Potentiale gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden durch Zugabe von Dithionit unter Anwesenheit von Redoxmediatoren erzeugt. Die Spektren wurden bei 12 K aufgenommen. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Um die Resonanzen der Spektren bei niedrigen Redoxpotentialen besser erkennen zu können, wurden die Resonanzen des [3Fe-4S]-Zentrums zwischen $g = 2,040$ und $1,998$ (das entspricht 3315-3385 G) bei den Spektren von + 116 mV bis + 28 mV entfernt. Zusätzlich wurden Resonanzen eines starken Radikalsignals (von den zugegebenen Viologen der Redoxmediatormischung) um $g = 2,00$ der Spektren bei –374 mV und –462 mV entfernt. Alle Spektren wurden unter nicht-gesättigten Bedingungen aufgenommen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

4.1.1. Erster Reduktionsschritt von + 219 mV bis –38 mV

Bei niedriger Temperatur (12 K) und Redoxpotentialen zwischen + 219 mV und –38 mV (gegen NHE) wird das ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase durch drei Resonanzen dominiert, dessen g-Werte bei $g = 2,028$, $g = 2,021$ und $g = 2,009$ liegen. Diese bilden ein axiales ESR-Signal mit $g_x = 2,028$ und $g_{y/z} = 2,016$ (Abbildung 40). Es kann als sicher angenommen werden, dass es sich hierbei um das ESR-Signal des [3Fe-4S]-Zentrums der Ethylbenzol Dehydrogenase handelt. Vergleicht man die Resonanzen dieses Signals mit den Resonanzen von Signalen anderer Molybdänenzyme, z.B. der Nitrat-Reduktase NarGHI, entsprechen diese Resonanzen sehr genau denen des Eisen-Schwefel Zentrums FS4, eines [3Fe-4S]-Zentrums (Blasco *et al.*, 2001). Nach Auftragung der Signalamplituden als Funktion des angelegten Potentials und Plots gegen die Nernst-Gleichung (Abbildung 42) ergeben sich die Redoxpotential-Werte in Tabelle 29 für [3Fe-4S]-Zentrums FS4 der Ethylbenzol Dehydrogenase bei Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung. Als Mittelwert der drei Werte ergibt sich ein Mittelpunkt-Redoxpotential des [3Fe-4S]-Zentrums FS4 von $70 \pm 6,6$ mV (Tabelle 29).

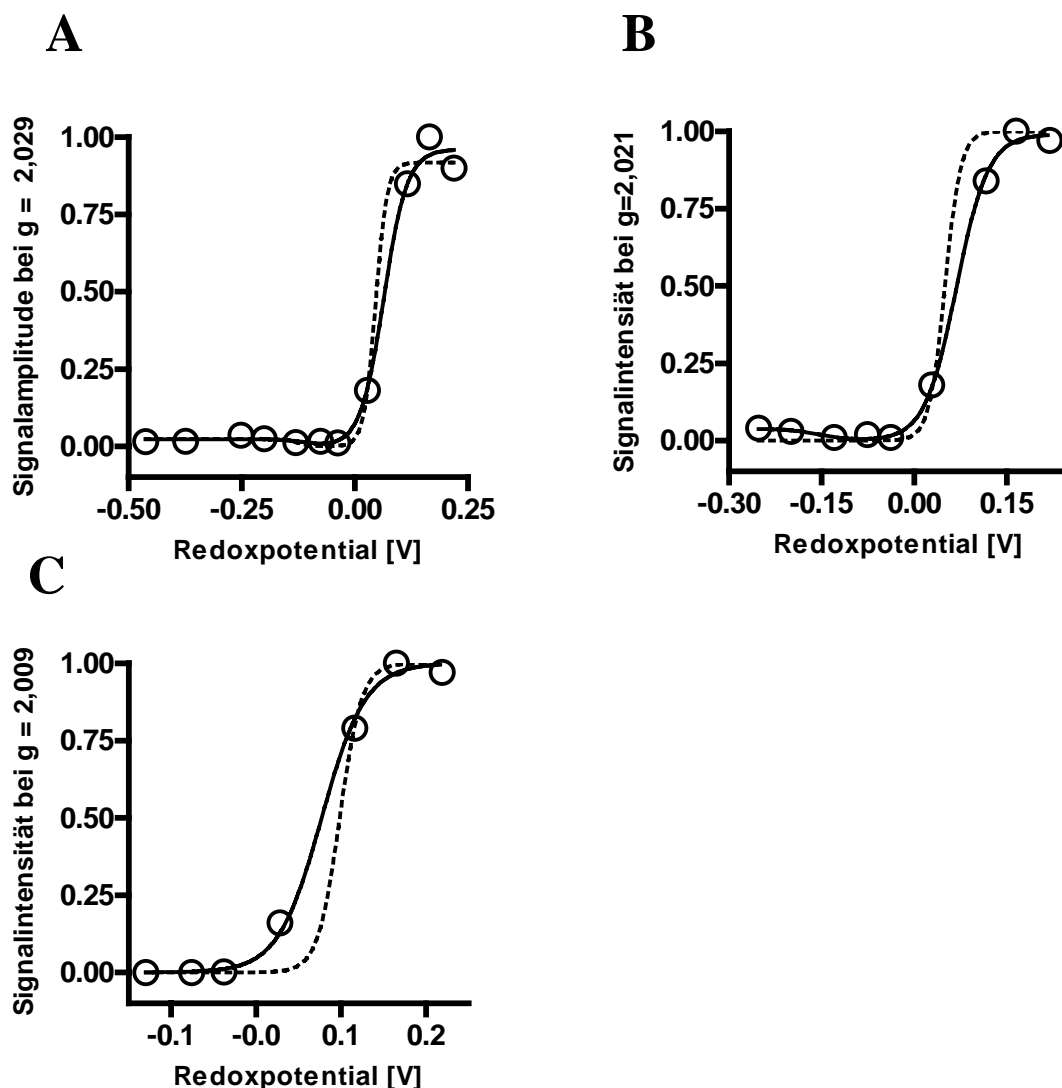


Abbildung 42: Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des [3Fe-4S]-Zentrums FS4 der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Signalintensität wurden bei folgenden Resonanzen gegen die angelegten Redoxpotentiale aufgetragen: (A) $g = 2,029$, (B) $g = 2,021$ und (C) $g = 2,009$. Die Graphen wurden gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 7) unter der Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung (durchgezogene Linie) und einer Zwei-Elektronen-Übertragung (gestrichelte Linie) gefittet. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Abbildungen A und B enthalten zusätzlich Nernst-Fits für [4Fe-4S]-Zentren, deren Mittelpunkt-Redoxpotential $-107,4$ mV (für $g = 2,029$) und $-153,5$ mV (für $g = 2,021$) betragen.

Tabelle 29: Mittelpunkt-Redoxpotential des [3Fe-4S]-Zentrums FS4 der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Resonanz	Mittelpunkt-Redoxpotential
$g = 2,029$	64,3 mV
$g = 2,021$	68,3 mV
$g = 2,009$	77,2 mV
[3Fe-4S] FS4	$70 \pm 6,6$ mV

4.1.2. Zweiter Reduktionsschritt von -38 mV bis -462 mV

Bei Redoxpotentialen zwischen -38 mV und -372 mV und einer Messtemperatur von 12 K zeigen die ESR-Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase typische Resonanzen von [4Fe-4S]-Zentren (Abbildung 41). Ein rhombisches Signal mit Resonanzen bei $g_z = 2,050$, $g_y = 1,950$ und $g_x = 1,885$ stimmt gut mit den Resonanzen der rhombischen Hauptkomponente des [4Fe-4S]-Zentrums FS1 der Nitratreduktase NarGHI überein (Guigliarelli *et al.*, 1992; Rothery *et al.*, 2004). Ein Nernst-Plot der entsprechenden Signalamplituden dieses Signals ergibt ein gemittelttes Mittelpunkt-Redoxpotential des Zentrums FS1 von $-15 \pm 6,6$ mV (Abbildung 43, Tabelle 30).

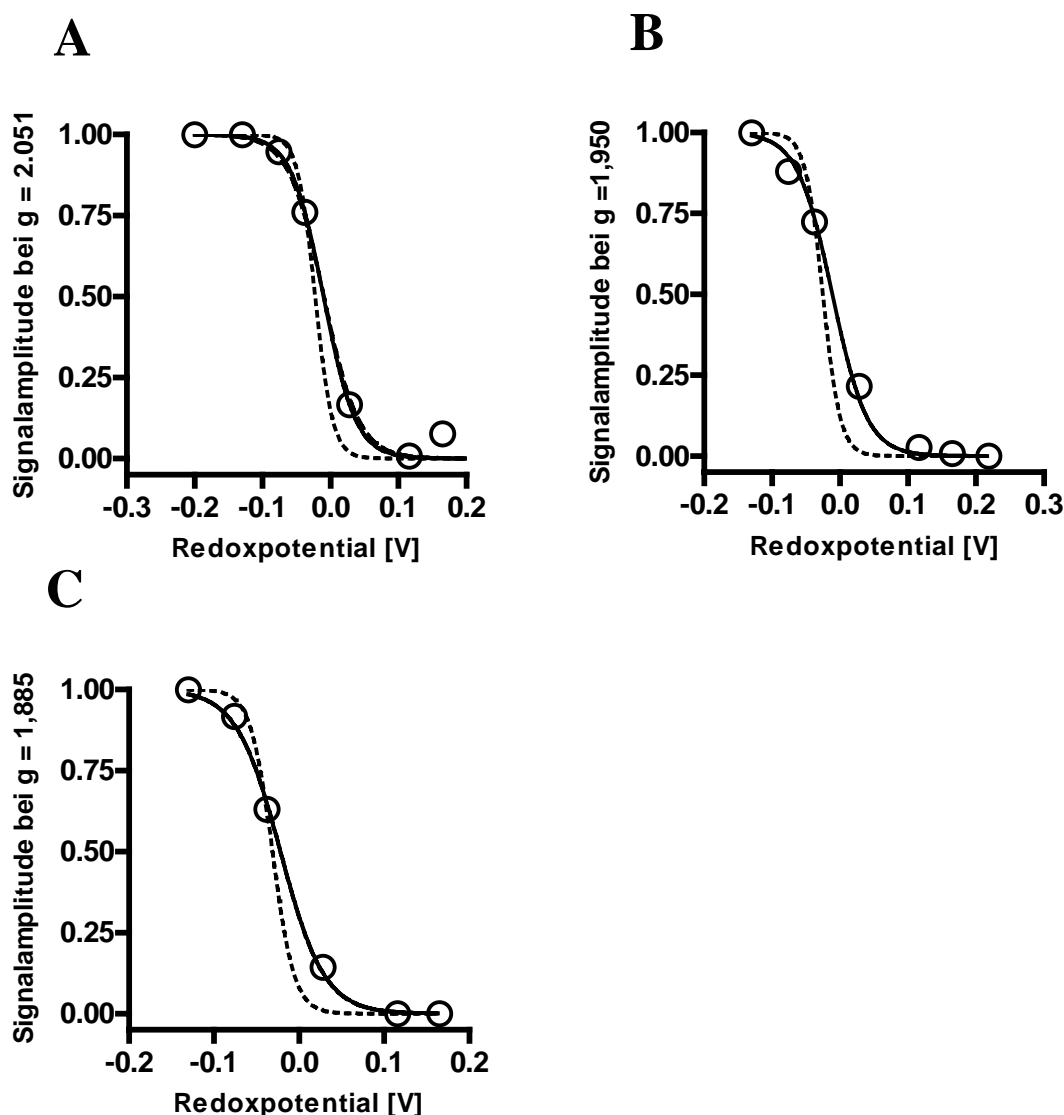


Abbildung 43: Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des [4Fe-4S]-Zentrums FS1 der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Signalintensität wurde bei folgenden Resonanzen gegen die angelegten Redoxpotentiale aufgetragen: (A) $g = 2,051$, (B) $g = 1,950$ und (C) $g = 1,885$. Die Graphen wurden gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 7) unter der Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung (durchgezogene Linie) und einer Zwei-Elektronen-Übertragung (gestrichelte Linie) gefittet. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Tabelle 30: Mittelpunkt-Redoxpotential des [4Fe-4S]-Zentrums FS1 der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Resonanz	Mittelpunkt-Redoxpotential
$g = 1,950$	-11,5 mV
$g = 1,885$	-22,0 mV
$g = 2,051$	-9,8 mV
[4Fe-4S] FS1	$-15 \pm 6,6$ mV

Die Spektren zeigen ab einem Redoxpotential von +28 mV zwei weitere Resonanzen bei $g = 2,071$ und $g = 1,910$. Diese Resonanzen sind vermutlich Teile eines rhombischen ESR-Signals eines weiteren [4Fe-4S]-Zentrums der Ethylbenzol Dehydrogenase. Vergleichbare Resonanzen eines [4Fe-4S]-Zentrums wurden bei der strukturell verwandten Formiat Dehydrogenase-N von *Desulfovibrio desulfuricans* (McDevitt *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 1997) und der Formiat Dehydrogenase von *Desulfovibrio alaskensis* (Brondino *et al.*, 2004) gefunden. Ein Plot der Signalamplituden gegen die Nernstgleichung ergibt nach Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung ähnliche Mittelpunkt-Redoxpotentiale ($-8,5$ mV für die Resonanz bei $g = 2,071$ und $-8,3$ mV für die Resonanz bei $g = 1,910$; Abbildung 44).

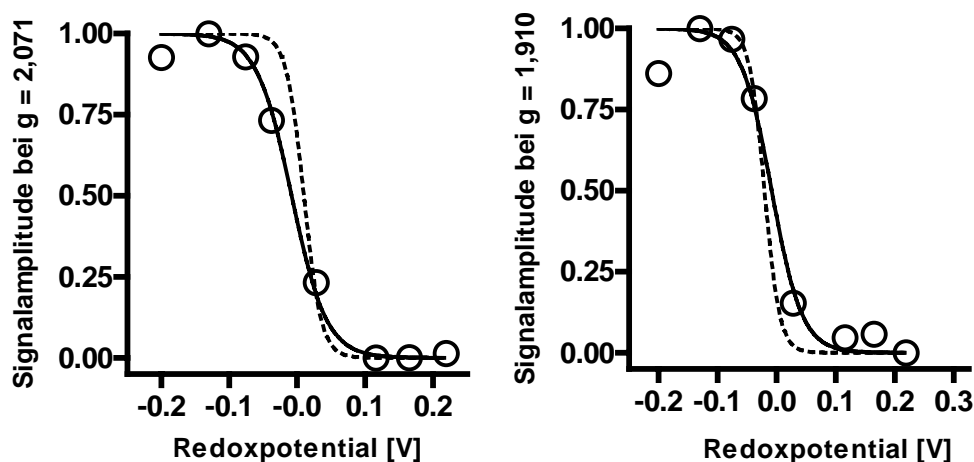


Abbildung 44: Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des [4Fe-4S]-Zentrum FS4 der Ethylbenzol Dehydrogenase als Funktion des angelegten Potentials. Die Signalintensität wurde bei folgenden Resonanzen gegen die angelegten Redoxpotentiale aufgetragen: (A) $g = 2,07$ und (B) $g = 1,910$. Die Graphen wurden gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 7) unter der Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung (durchgezogene Linie) und einer Zwei-Elektronen-Übertragung (gestrichelte Linie) gefittet. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Diese Resonanzen entsprechen vermutlich den Resonanzen des [4Fe-4S]-Zentrum FS4 der Ethylbenzol Dehydrogenase, welches demnach ein Mittelpunkt-Redoxpotential von $-8,4 \pm 0,1$ mV hat (Tabelle 31).

Tabelle 31: Mittelpunkt-Redoxpotential des [4Fe-4S]-Zentrums FS3 der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Resonanz	Mittelpunkt-Redoxpotential
$g = 2,071$	-8,5 mV
$g = 1,910$	-8,3 mV
[4Fe-4S] FS3	-8,4 ± 0,1 mV

Im Bereich von $g \approx 1,9$ ändern sich die Resonanzen der [4Fe-4S]-Zentren mit sinkendem Redoxpotential und führen zu einem breiten und unstrukturierten Spektrum bei -462 mV (Abbildung 45 B). Die Gestalt dieses ESR-Spektrums ist ähnlich zu dem Spektrum der Nitrat-reduktase A von *Escherichia coli* bei -487 mV, welches auch sehr breit ausläuft und kann als ein Indiz für die Reduktion eines weiteres Eisen-Schwefel-Zentrums, des [4Fe-4S]-Zentrums FS2, angesehen werden (Guigliarelli *et al.*, 1992; Magalon *et al.*, 1998). Die Gesamtgestalt des Spektrums und die Gegenwart breiter Resonanzen bei $g \approx 1,9$ sind typisch für Spektren von [4Fe-4S]-Zentren, welche magnetisch an andere Eisen-Schwefel-Zentren gekoppelt sind. Dies würde eintreten, wenn die FeS1 und FeS3 nicht mehr als isolierte ESR-aktive Zentren mit einem diamagnetischen (oxidierten) FeS2-Zentrum zwischen sich vorliegen, sondern nach Reduktion von FeS2 aufgrund der räumlichen Nähe der drei [4Fe-4S]- Zentren in magnetische Kopplung treten. Das beobachtete Spektrum bei der Ethylbenzol Dehydrogenase ist also ein guter Hinweis darauf, dass wie bei der Nitratreduktase das FeS2-Zentrum ein [4Fe-4S]-Zentrum mit Mittelpunkt-Redoxpotential von unterhalb -400 mV ist.

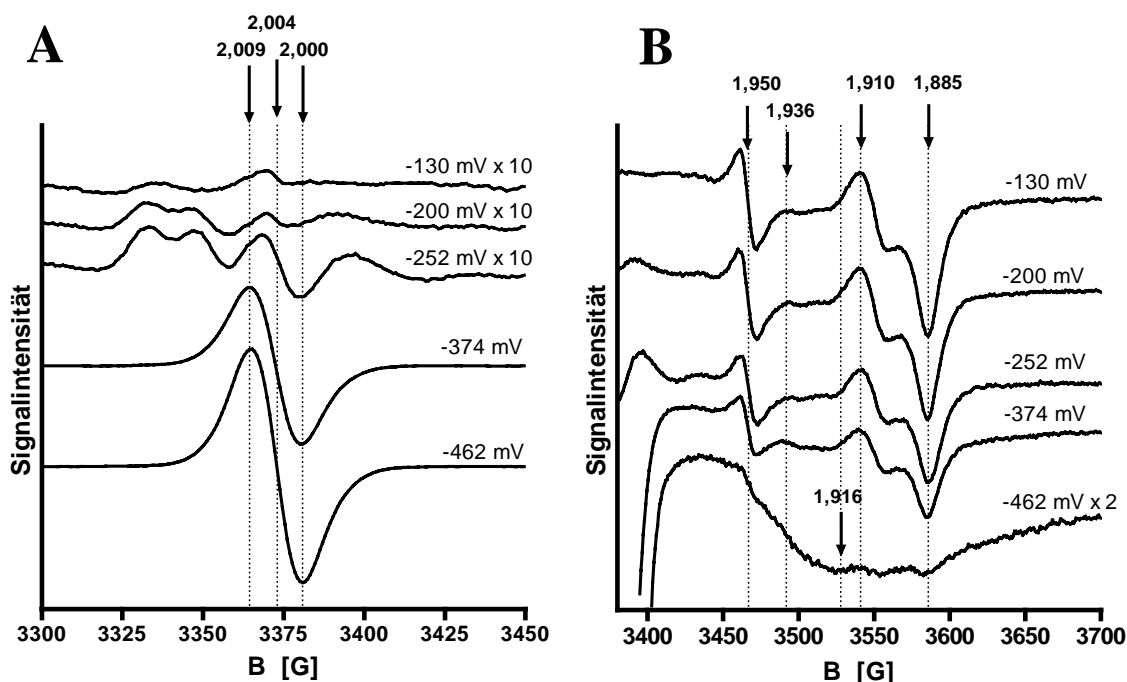


Abbildung 45: ESR-Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase bei verschiedenen Redoxpotentialen von -130 mV bis -462 mV. Das Spektrum wurde im (A) $g \approx 2,0$ und (B) $g \approx 1,9$ Bereich aufgenommen. Die Potentiale gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden durch Zugabe von Dithionit unter Anwesenheit von Redoxmediatoren erzeugt. Die Spektren wurden bei 12 K aufgenommen. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Alle Spektren wurden unter nicht-gesättigten Bedingungen aufgenommen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Das [4Fe-4S]-Zentrums FS0 der Alpha Untereinheit der Nitratreduktase aus *Escherichia coli* ist ein ungewöhnliches [4Fe-4S]-Zentrum (Rothery *et al.*, 2004). Als vierten Liganden besitzt dieses Zentrum anstelle eines Cysteins ein Histidin. Die Sequenzanalyse der Alpha-Untereinheiten einiger Molybdänenzyme der DMSO-Reduktase Familie ergab, dass dieser Histidin-Ligand bei allen Enzymen der Subfamilie Typ II, einschließlich der Ethylbenzol Dehydrogenase, konserviert ist (Yoshimatsu *et al.*, 2002; Rothery *et al.*, 2004; Abbildung 77). Des weiteren wurde im Verlauf dieser Arbeit ein [4Fe-4S]-Zentrum (FS0) in der Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase detektiert, bei welchem der vierte Ligand, ein Histidin anstelle eines Cysteins ist (Diskussion 1.1.)

ESR-Untersuchungen des FS0 Zentrums der Nitratreduktase A ergaben, dass es sich bei diesem [4Fe-4S]-Zentrum um ein neuartiges, „High-Spin“-Eisen-Schwefel-Zentrum handelt, dessen Resonanzen bei $g = 5,023$ und $g = 5,556$ liegen. Um die Resonanzen des [4Fe-4S]-Zentrums FS0 der Ethylbenzol Dehydrogenase zu detektieren, wurden ESR-Spektren unter ähnlichen Bedingungen aufgenommen (Abbildung 46A). Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied

zwischen den einzelnen Spektren der Redoxstufen detektiert (Abbildung 46B). Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das in dieser Arbeit verwendete ESR-Spektrometer ein deutlich schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis hatte, als das Gerät, das für die Messungen der ESR-Spektren der Nitratreduktase A verwendet wurde.

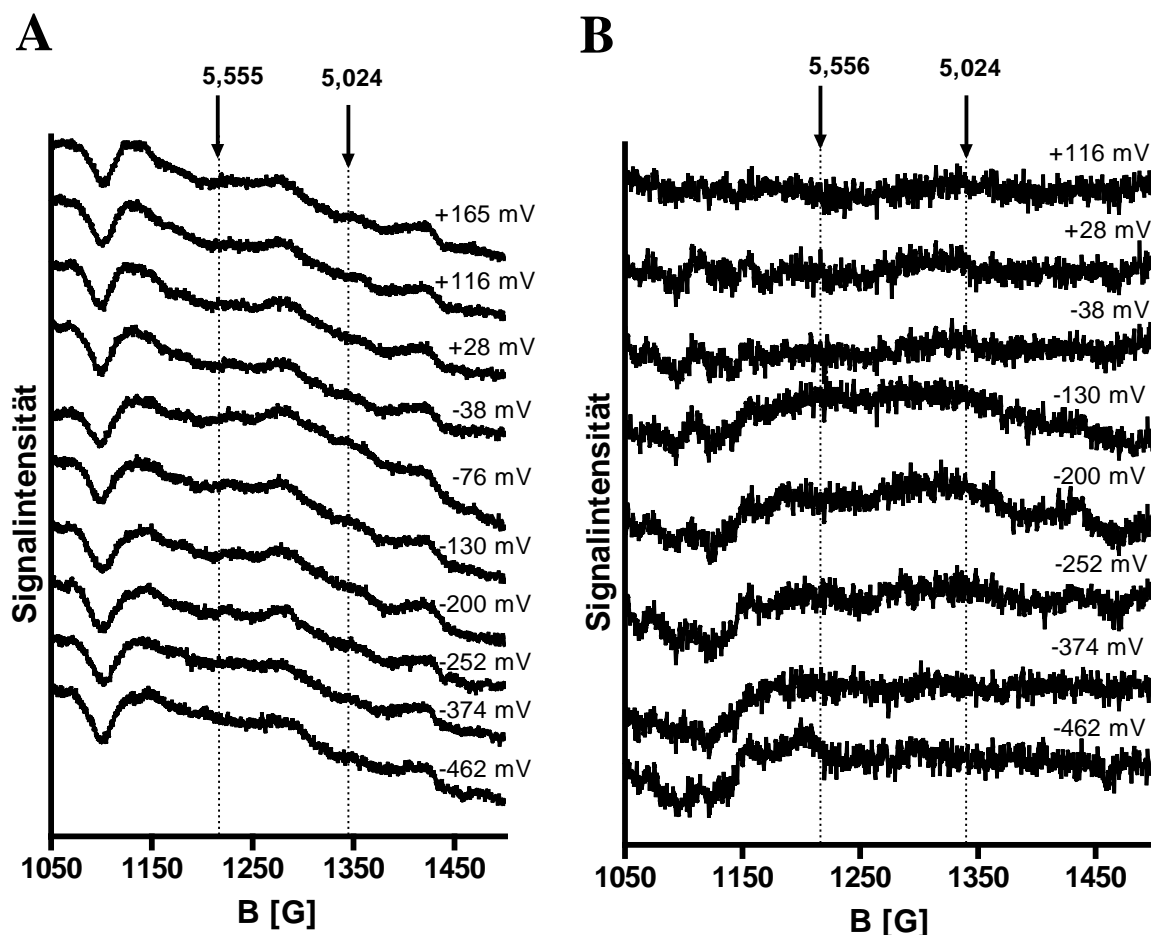


Abbildung 46: ESR-Spektren (A) und ESR-Differenzspektren (B) der Ethylbenzol Dehydrogenase im $g \approx 5,0$ Bereich bei verschiedenen Redoxpotentialen von + 165 mV bis –462 mV. Gezeigt sind (A) ESR-Spektren und (B) ESR-Differenzspektren der Ethylbenzol Dehydrogenase, wobei das Spektrum bei +165 mV als Referenz diente und von allen anderen Spektren abgezogen wurde. Die Potentiale gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzol Dehydrogenase ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden durch Zugabe von Dithionit unter Anwesenheit von Redoxmediatoren erzeugt. Die Spektren wurden bei 9 K aufgenommen. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Alle Spektren wurden unter nicht-gesättigten Bedingungen aufgenommen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 100 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,1 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

4.2. Redoxpotential des Redoxmediators Benzylviologen-Dichlorid

Die Reduktion des Enzyms bis -462 mV führt zu einem großen isotropen Radikalsignal bei $g_{xyz} = 2,004$ (Abbildung 45 A). Nach Plotten der Signalamplituden der Resonanzen bei $g = 2,009$ und $g = 2,000$ ergibt sich nach Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung ein Mittelpunkt-Redox-

potential von $-355 \pm 0,5$ mV (Abbildung 47). Dieses Mittelpunkt-Redoxpotential entspricht nahezu dem Potential des Redoxmediators Benzylviologen-Dichlorid (-360 mV).

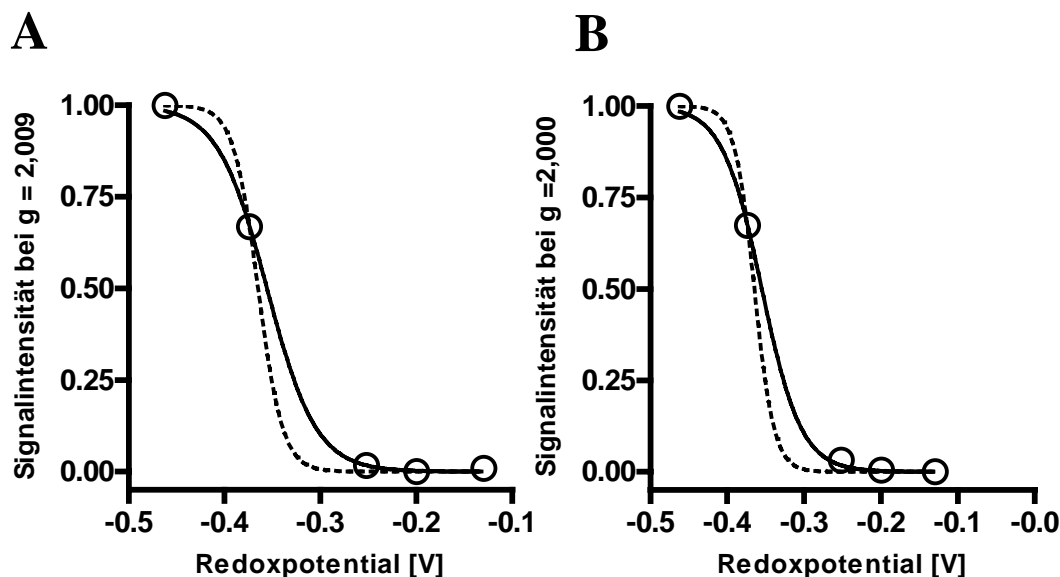


Abbildung 47: Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des isotropen Radikalsignals bei $g_{xyz} = 2,004$ im ESR-Spektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Signalintensität wurde bei folgenden Resonanzen gegen die angelegten Redoxpotentiale aufgetragen: (A) $g = 2,009$ und (B) $g = 2,000$. Die Graphen wurden gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 7) unter der Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung (durchgezogene Linie) und einer Zwei-Elektronen-Übertragung (gestrichelte Linie) gefittet. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

4.3. Redoxpotential des Molybdäns im Molybdopterin-Dinukleotid Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase

Bei höheren Temperaturen (60 K) verbreiterten sich die Signale der Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase durch relaxierende Effekte so stark, dass sie in der Basislinie verschwanden (Ergebnisse 3.2.1. und 3.2.3.). Ein neues, axiales Signal erscheint unter diesen Bedingungen bei Redoxpotentialen zwischen $+219$ mV und -76 mV (Abbildung 48). Resonanzen bei $g = 1,987$, $g = 1,981$ und $g = 1,961$ dominieren dieses Spektrum. Dieses Signal ist identisch zu dem Mo(V)-Signal der NarG-Untereinheit der Nitratreduktase von *Escherichia coli* (Magalon *et al.*, 1998).

Die Signalamplituden dieses Signals zeigten als Funktion des angelegten Redoxpotentials einen glockenförmigen Graphen mit einem Maximum von ca. $+154 \pm 3$ mV (Abbildung 49). Nachdem diese Variationen der Signalamplitude mit Nernst-Kurven gefittet wurden, die zwei Ein-Elektronen Redoxprozessen entsprechen, wurden als Mittelpunkt-Redoxpotentiale der Mo(IV)/(V)- und Mo(V)/(VI)-Redoxpaare $+82 \pm 3,8$ mV und $+223 \pm 2,8$ mV ermittelt (Tabelle 32).

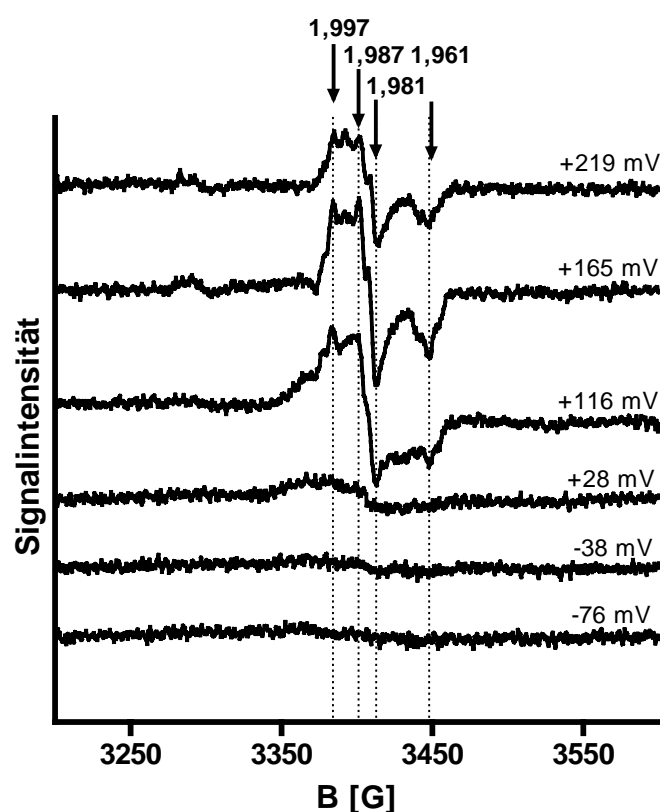


Abbildung 48: Mo(V) ESR-Signale der Ethylbenzyl Dehydrogenase bei verschiedenen Redoxpotentialen von + 219 mV bis –76 mV und 60 K. Die Potentiale gereinigter und ankonzentrierter Ethylbenzyl Dehydrogenase ($3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden durch Zugabe von Dithionit unter Anwesenheit von Redoxmediatoren erzeugt. Die Spektren wurden bei 60 K aufgenommen. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Alle Spektren wurden unter nicht-gesättigten Bedingungen aufgenommen. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: 5 mW Mikrowellenleistung, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,4 mT Modulationsamplitude, 1 Scan.

Tabelle 32: Mittelpunkt-Redoxpotential des Molybdopterin-Dinukleotid Kofaktors (MGD) der Ethylbenzyl Dehydrogenase. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Resonanz	Mittelpunkt-Redoxpotential	
	Mo IV/V	Mo V/VI
$g = 1,987$	81,7mV	219,4 mV
$g = 1,981$	86,5 mV	224,7 mV
$g = 1,961$	78,9 mV	223,8 mV
MGD	$82 \pm 3,8 \text{ mV}$	$223 \pm 2,8 \text{ mV}$

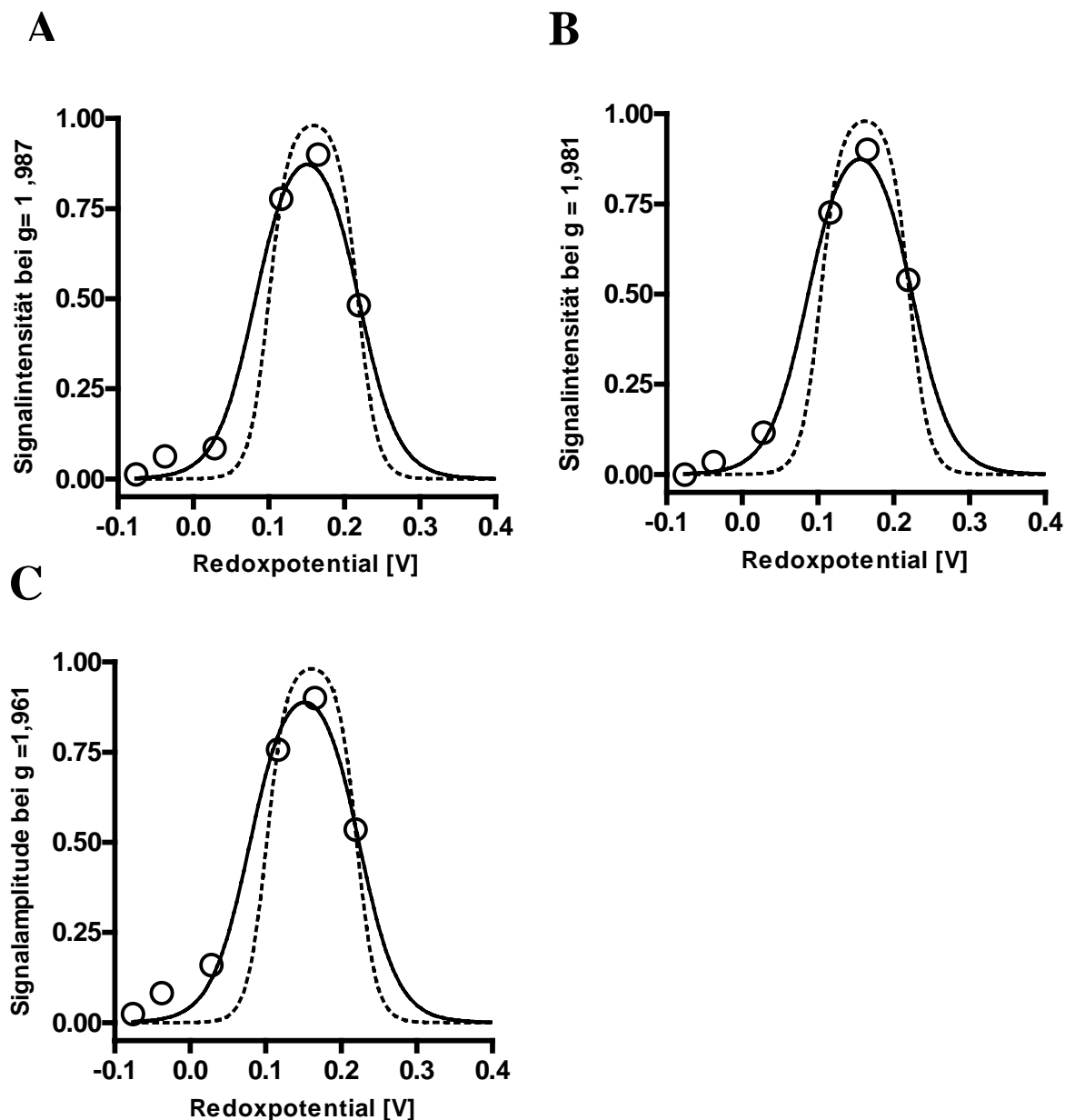


Abbildung 49: Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des Molybdopterin-Dinukleotid Kofaktors (MGD) der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Signalintensitäten wurden bei folgenden Resonanzen gegen die angelegten Redoxpotentiale aufgetragen: (A) $g = 2,051$, (B) $g = 1,950$ und (C) $g = 1,885$. Die Graphen wurden gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 7) unter der Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung (durchgezogene Linie) und einer Zwei-Elektronen-Übertragung (gestrichelte Linie) gefittet, wobei für das Molybdän im Molybdopterin-Dinukleotid Kofaktor jeweils eine Übertragung eines Elektron angenommen werden kann. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

5. Bestimmung des Redoxpotentials des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase

Das Mittelpunkt-Redoxpotential des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase wurde über eine elektrochemisch-induzierte Redox-Differenzspektroskopie bestimmt. Gereinigte und hoch ankonzentrierte Ethylbenzol Dehydrogenase (87 mg/ml) im Puffer des letzten Reinigungsschritts (10 mM Tris-Acetat pH 8, 100 mM Kaliumchlorid, 160 mM Kaliumphosphat, 100 μ M Ferrizinium-Tetrafluorborat, 10 % Glycerin) wurde dafür mit Redoxmediatoren versetzt, die als Vermittler für die Einstellung des Potentials zwischen der Elektrode und dem Enzym dienen, und in eine elektrochemische Dünnschichtzelle mit optisch-transparentem Fenster aus Quarzglas. Diese bestand aus einer Dreielektrodenanordnung mit einer Goldnetz-Arbeits Elektrode, einer Platin-Gegenelektrode und Ag/AgCl-Referenzelektrode (Material und Methoden 4.2.). Die Messungen wurden unter aeroben Bedingungen bei 6 °C durchgeführt. Die UV-Vis-Spektren des Enzyms wurden innerhalb eines Potentialbereiches zwischen +137 mV und +387 mV aufgenommen; das Enzym wurde dabei elektrochemisch in Schritten von ca. 25 mV oxidiert. Die Gleichgewichtseinstellung wurde jeweils in weniger als 10 Minuten erreicht. Am Ende der Messreihe wurde wiederum ein Potential von +137 mV eingestellt, um die Reversibilität der Redoxübergänge zu überprüfen.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren der Ethylbenzol Dehydrogenase zeigte bei den Potentialen von + 137 mV und + 387 mV eine Verschiebung der Soretbande des Häm *b*-Kofaktors von 424 nm auf 414 nm (Abbildung 50). Gleichzeitig verringern sich charakteristische Häm *b* Resonanzen bei 528 nm und 559 nm und diejenigen der Eisen-Schwefel-Zentren (420-500 nm) (Abbildung 50 und Abbildung 51). Dies zeigt an, dass das Häm *b* in der Ausgangsprobe noch komplett reduziert war und bei einem Potential von +387 mV komplett oxidiert vorlag. Die fortschreitende Blauverschiebung der Soretbande bei der Redoxtitration korreliert mit dem Redoxzustand des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase, wie in Abbildung 51 gezeigt. Die Reversibilität der Oxidation und Re-Reduktion wurde überprüft, indem Differenzspektren gebildet wurden vom Spektrum des voll oxidierten Enzyms (bei +387 mV) mit dem Spektrum der Ausgangsprobe („ox-red“) und vom Spektrum der re-reduzierten Probe mit dem Spektrum des oxidierten Enzyms („red-ox“). Beide Differenzspektren verhalten sich zueinander wie Spiegelbilder (Abbildung 52).

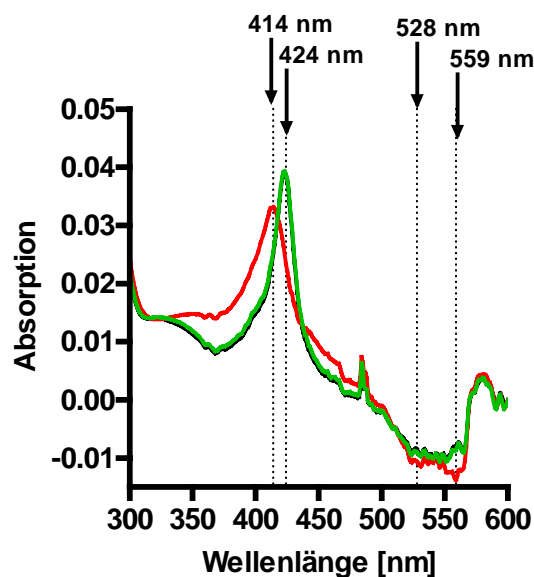


Abbildung 50: UV-Vis-Spektren der Ethylbenzol Dehydrogenase bei Redoxpotentialen von +137 mV und +287 mV. Die Potentiale der gereinigten und ankonzentrierten Ethylbenzol Dehydrogenase (87 mg ml^{-1}) wurden in Anwesenheit von Redoxmediatoren bei elektrochemisch eingestellten Potentialen bei 6°C aufgenommen. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Gezeigt sind die UV-Vis Spektren des oxidierten Enzyms bei +287 mV (rot) und des reduzierten Enzyms bei +137 mV in der Ausgangsprobe (schwarz) und nach Re-Reduktion auf +137 mV am Ende des Versuchs (grün).

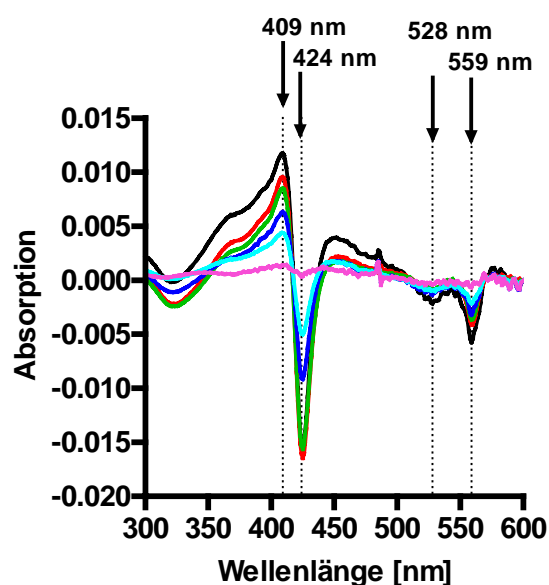


Abbildung 51: UV-Vis Differenzspektren der Ethylbenzol Dehydrogenase zwischen oxidiertem und reduziertem Enzym. Als reduzierte Referenz diente jeweils das Ausgangsspektrum bei einem Potential von +137 mV. Dieses wurde von den Spektren abgezogen, die bei folgenden Potentialen gemessen wurden: +387 mV (schwarz), +337 mV (rot), +287 mV (grün), +262 mV (blau), +237 mV (hellblau), +187 mV (violett).

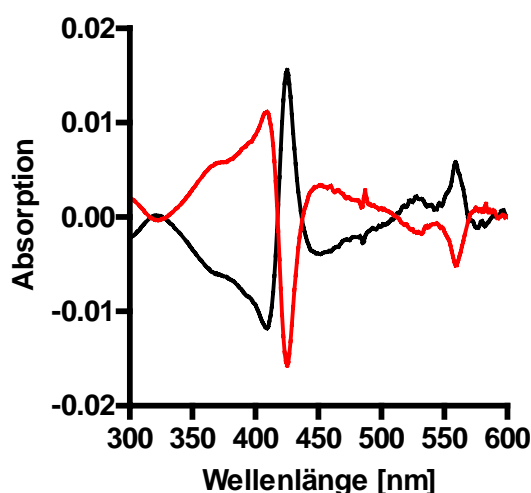


Abbildung 52: UV-Vis Differenzspektren der Ethylbenzol Dehydrogenase. Gezeigt sind die UV-Vis Differenzspektren zwischen oxidiertem und reduziertem Ethylbenzol Dehydrogenase (bei +387 mV bzw. +137 mV), wobei das Spektrum des oxidierten Enzyms von dem des reduzierten abgezogen wurde (schwarz), bzw. und das Spektrum des am Ende des Versuchs re-reduzierten Enzyms von dem des oxidierten (rot). Die Unregelmäßigkeit zwischen 484 und 489 nm ist auf den Lampenwechsel des Spektrometers zurückzuführen.

Um das Mittelpunkt-Redoxpotential des Häm *b*-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase zu bestimmen, wurde die Signalamplitude bei verschiedenen, charakteristischen Wellenlängen des Häm *b*-Kofaktors (bei 424 nm, 528 nm und 559 nm) als Funktion des angelegten Potentials aufgetragen und gegen die Nernstgleichung (Gleichung 7) gefittet (Abbildung 53). Bei Annahme einer Ein-Elektronenübertragung ergeben sich die Redoxpotential-Werte in Tabelle 33. Als Mittelwert dieser drei Werte ergibt sich ein Mittelpunkt-Redoxpotential von $256 \pm 0,7$ mV.

Tabelle 33: Mittelpunkt-Redoxpotential des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben.

Resonanz	Mittelpunkt-Redoxpotential
424 nm	255,6 mV
528 nm	256,2 mV
559 nm	257,0 mV
Häm <i>b</i>	$256 \pm 0,7$ mV

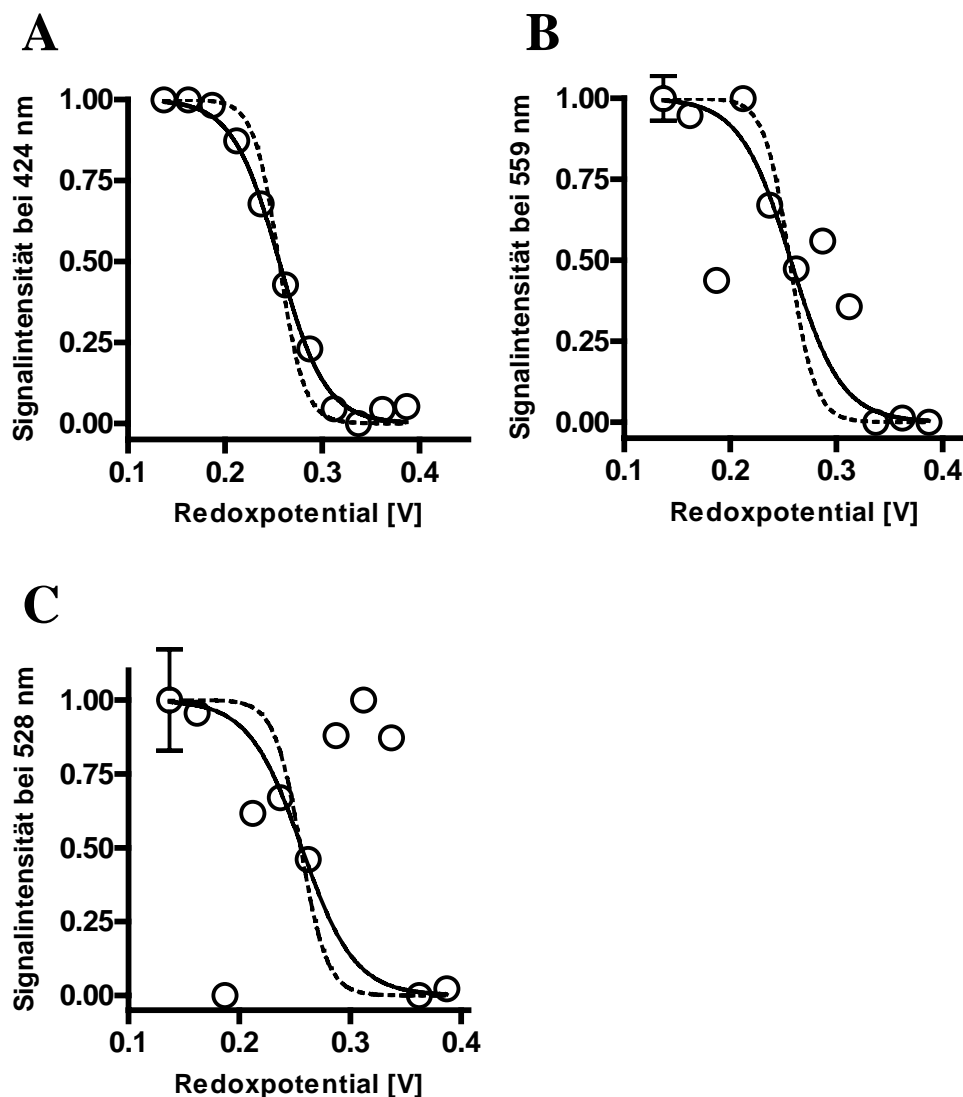


Abbildung 53: Nernst-Plot zur Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Signalintensität wurden bei folgenden Resonanzen gegen die angelegten Redoxpotentiale aufgetragen: **(A)** 424 nm, **(B)** 559 nm und **(C)** 528 nm. Die Graphen wurden gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 7) unter der Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung (durchgezogene Linie) und einer Zwei-Elektronen-Übertragung (gestrichelte Linie) gefittet, wobei zur Bestimmung des Mittelpunkt-Redoxpotentials des Häm *b*-Kofaktor ein Übergang von einem Elektron angenommen wurde. Die Redoxpotentiale sind gegen die Standardwasserstoffelektrode (NHE) angegeben. In Spektrum (B) und (C) wurden Amplitudenwerte, die stark abwichen (Amplitude bei Redoxpotentialen von 337 mV, 312 mV, 287 mV, 212 mV und 187 mV), beim Nernst-Plot vernachlässigt.

6. Herstellung von „Broad-Host-Range“-Vektoren zur Klonierung der Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase

Das Enzym Ethylbenzol Dehydrogenase wird durch drei Gene kodiert (*ebdA*, *ebdB* und *ebdC*), wobei noch ein viertes Gen (*ebdD*) für die Reifung des Proteins notwendig ist. Das *ebdD*-Genprodukt ist ähnlich zu sogenannten „private Chaperones“, die bei anderen Enzymen der DMSO-Familie für die letzten Schritte des Einbaus des Molybdän-Cofaktor notwendig sind (Rabus *et al.*, 2002). Eine plasmidkodierte Expression dieser Ethylbenzol Dehydrogenase-Gene wäre vorteilhaft, um Mutagenese-Experimente durchführen zu können. Des weiteren könnte die Funktion des „private Chaperones“ EbdD bei der Reifung der Ethylbenzol Dehydrogenase überprüft werden. Da überdies im Genom von Stamm EbN1 noch ein zweites Operon mit paralogenen Genen gefunden wurde, deren Funktion bisher unbekannt ist, wäre auch eine plasmidkodierte Expression dieses Operons zum Studium des alternativen Isoenzym wünschenswert.

Bereits in früheren Arbeiten wurden die Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase (*ebdABCD*) in den Expressionsvektor pTrc99a kloniert und in *E. coli* DH5 α überexprimiert (Bartholomä, 2004). Jedoch wurde keine sichtbare Synthese der Untereinheiten und nur eine geringe Aktivität von 6,6 nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹ in Zellextrakten anaerob angezogener Zellen detektiert. Da Enzymaktivität nur bei anaerober Anzucht der rekombinanten *E. coli*-Zellen gemessen wurde, wird das überproduzierte Enzym eventuell in aeroben Zellen inaktiviert. Eine derartige Inaktivierung durch Sauerstoff wurde auch mit der nativen Ethylbenzol Dehydrogenase aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 beobachtet, allerdings nur nach Reinigung bei der reduzierten Form des Enzyms, während das Enzym im Zellextrakt nicht von Sauerstoff beeinträchtigt wird (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Im Gegensatz zu der Situation im Stamm EbN1, wo das Enzym durch natürliche Elektronenakzeptoren im oxidierten Zustand gehalten wird, liegt das Enzym im Extrakt von überproduzierenden *E. coli*-Zellen also vielleicht in der reduzierten, Sauerstoff-sensitiven Form vor.

Um die Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase auch homolog oder in verwandten *Aromatoleum*-Stämmen, wie zum Beispiel *Aromatoleum evansii*, zu exprimieren, wurden mobilisierbare „Broad-Host-Range“-Expressionsvektoren konstruiert. Diese Vektoren haben den Vorteil, dass die Klonierung in *E. coli* durch Standardmethoden ausgeführt werden kann und die rekombinanten Plasmide anschließend durch Konjugation in unterschiedliche Wirtsorganismen übertragen werden können (Davison, 2002).

Die Grundlage dieser „Broad-Host-Range“-Vektoren bildet ein pBBR1-Derivat, welches ein Ampicillin-Resistenzgen besitzt (pBBR1-MCS4). Dieses Derivat stammt ursprünglich aus *Bordetella bronchiseptica*. Es verfügt über drei *rep*-Gene, die zusammen mit dem „Origin of Replication“ (*oriV*) für die Replikation des Plasmids verantwortlich sind. Drei *mob*-Gene und der

„Origin of Transfer“ (*oriT*) werden für die Mobilisierung benötigt. Diese beiden funktionellen Replikations- und Mobilisierungs-Kassetten bilden zusammen mit den anderen Genen ein kleines und stabiles Replikon. Zusätzlich beherbergt ein *lacZα*-Komplement eine „Multiple Cloning Site“ (MCS), in welche DNA-Fragmente einfach kloniert werden können. Allerdings besitzt pBBR1-MCS4 nur einen schwachen *lacZ*-Promotor, der vermutlich nur unzureichende Expressionsraten der eingebrachten Gene ermöglicht. Deshalb wurden Hybridvektoren aus dem Plasmid pBBR1-MCS4 und dem Expressionvektor pTrc99a hergestellt, in denen der *trc*-Promotor und eine optimale Ribosomenbindestelle vorhanden ist.

Um die starken Expressionseigenschaften des *trc*-Promotors optimal auszunützen, wurden im optimalen Abstand zum Promotor jeweils Restriktionsschnittstellen eingefügt, mit welchen das gewünschte Fragment später direkt mit seinem Startcodon kloniert werden kann (*NdeI* bzw. *NcoI*). Die Klonierungsstrategien der beiden Hybridvektoren (pBBR1MCS-4/pTrc99a/*NdeI* und pBBR1-MCS4/pTrc99a/*NcoI*) sind in Abbildung 54 und 55 dargestellt. Die jeweilige Sequenz der ribosomalen Bindestelle und multiplen Klonierungsstelle der beiden Hybridvektoren sind in Abbildung 56 und 57 dargestellt.

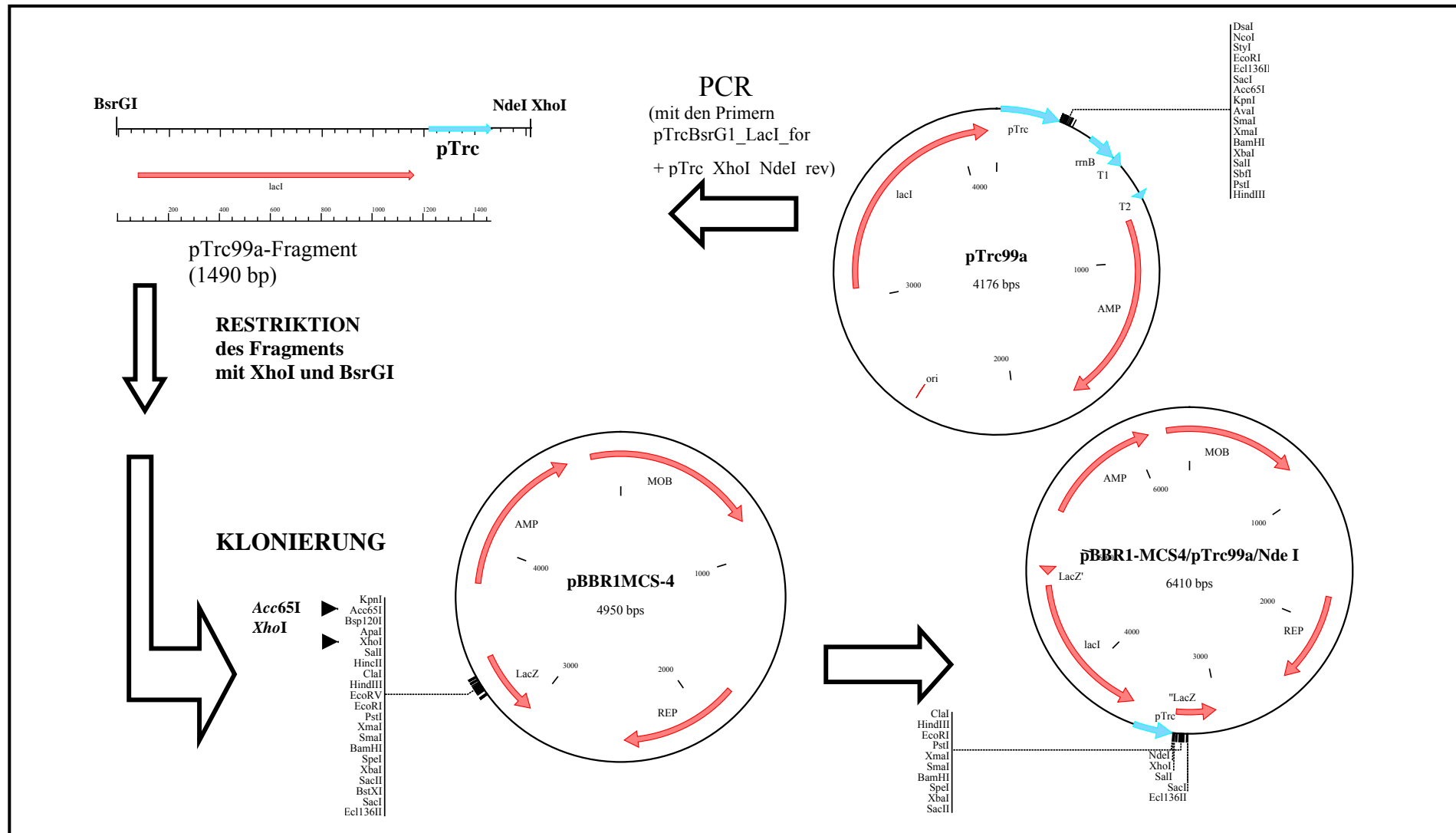


Abbildung 53: Herstellung des Hybridvektor pBBR1-MCS4/pTrc99a/NdeI.

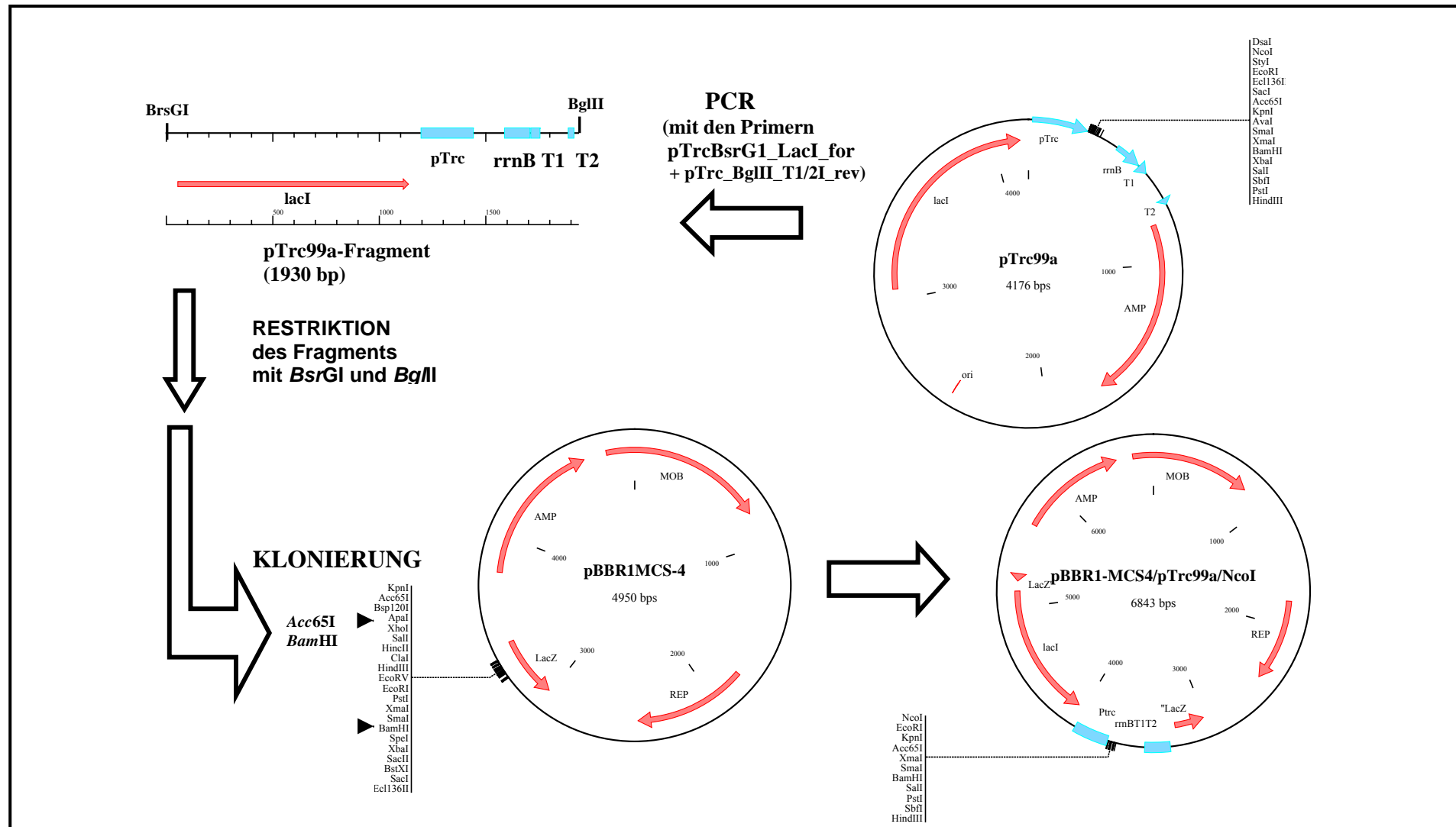


Abbildung 54: Herstellung eines Hybridvektors pBBR1-MCS4/pTrc99a/NcoI

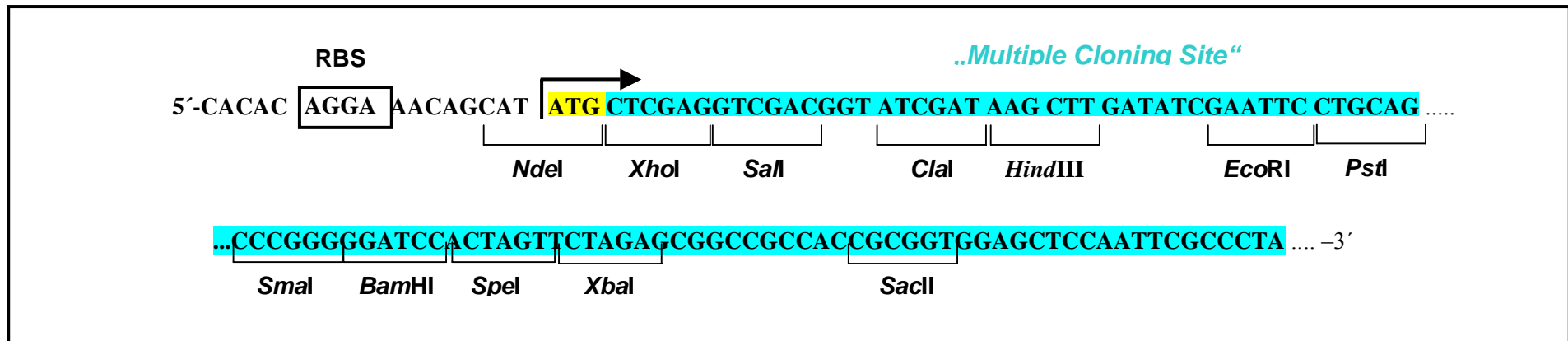


Abbildung 55: Ausschnitt aus dem Hybridvektor pBBR1-MCS4/pTrc99a/NdeI. Die Abbildung zeigt die Sequenz der Ribosomenbindestelle (RBS) und die multiple Klonierungsstelle („Multiple Cloning Site“) des Vektors. Mit Hilfe der Schnittstelle *NdeI* kann das gewünschte Fragment direkt mit seinem Startcodon kloniert werden.

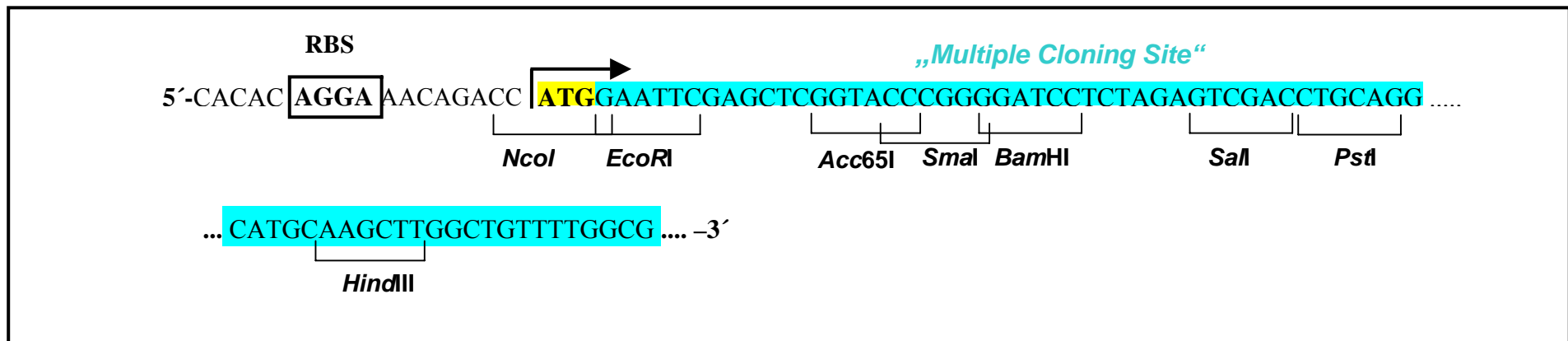


Abbildung 56: Ausschnitt aus dem Hybridvektor pBBR1-MCS4/pTrc99a/NcoI. Die Abbildung zeigt die Sequenz der Ribosomenbindestelle (RBS) und die multiple Klonierungsstelle („Multiple Cloning Site“) des Vektors. Mit Hilfe der Schnittstelle *NcoI* kann das gewünschte Fragment direkt mit seinem Startcodon kloniert werden.

7. Rekombinante Produktion der Benzoylacetat-CoA Ligase

Bereits in früheren Studien wurde die Benzoylacetat-CoA Ligase aus *Aromatoleum aromaticum* weitgehend angereichert (Hagel, 2003). Doch trotz langwieriger Bemühungen wurde das Enzym nicht vollständig gereinigt. Die Reinigung des Enzyms aus dem Wildtyp war aus mehreren Gründen sehr schwierig: (i) die Aktivität ging nach einzelnen Chromatographieschritten oder nach Einfrieren der Fraktionen größtenteils verloren, und (ii) das angereicherte Enzym war immer noch zu sehr mit anderen Proteinen kontaminiert, die unter identischen Bedingungen von allen Säulen eluierten. Die hauptsächliche Verunreinigung in den Präparationen wurde aufgrund der N-terminalen Sequenz als Benzoat-CoA Ligase von Stamm EbN1 identifiziert. Daraufhin wurde die Benzoylacetat-CoA Ligase rekombinant im Expressionsvektor pTrc99a überproduziert. Dennoch war auch dabei die Reinigung des Enzyms schwierig, da viel unlösliche Einschlusskörperchen gebildet wurden und das lösliche Enzym seine Aktivität bereits nach dem ersten Reinigungsschritt größtenteils verloren hatte.

7.1. Klonierung des postulierten Gens der Benzoylacetat-CoA Ligase

Um die Aufreinigung der Benzoylacetat-CoA Ligase zu ermöglichen, wurde das postulierte Benzoyl-acetat-CoA Ligase-Gen *bal* (Rabus *et al.*, 2002) in dieser Arbeit in den Expressionsvektor pBAD102/ D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Konstruktion eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen Histidin-Patch-Thioredoxin und einem C-terminalen His-Tag (6 x His). Das Histidin-Patch-Thioredoxin enthält zwei zu Histidinresten mutierte Aminosäuren, welche sich bei Faltung des Proteins mit einem weiteren Histidinrest zu einer Metall-Bindedomäne formen. Diese Domäne hat eine hohe Affinität zu bivalenten Kationen, zum Beispiel Nickel-Ionen und ermöglicht die Reinigung über Affinitätschromatographie an Nickel-Sepharose. Zudem erhöht das Thioredoxin (11,7 kDa) als Fusionspartner die Translationseffizienz und die Löslichkeit von überproduzierten Proteinen.

Der Expressionsvektor pBAD102/D-TOPO besitzt einen Arabinose-induzierbaren Promotor P_{BAD}, ein Regulatorprotein AraC, als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und den Origin der pUC-Plasmide für die Expression in *Escherichia coli*. Bei dem verwendeten Klonierungssystem liegt der Vektor als offenes Plasmid vor. An beiden Enden des Vektors sind Topoisomerasen vom Typ I kovalent gebunden, welche eine Selbstligation des Vektors verhindern. Das überhängende 5'-Ende des Vektors mit der Sequenz GTGG paart mit der durch PCR eingefügten komplementären Sequenz CACC der PCR Produkte.

Zur Klonierung des hypothetischen Gens *bal* der Benzoylacetat-CoA Ligase wurde das DNA-Fragment aus genomischer DNA von *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 mittels PCR mit einem Gemisch aus Taq- und Pfu-Polymerase (1:2) amplifiziert (Material und Methoden 5.3.). Hierfür wurden die Primer pBadTOPO_bcl_for und pBadTOPO_bcl_rev verwendet (Material und Methoden, Tabelle 3). Das erhaltene PCR-Fragment (~1,4 kb) wurde nach Angaben des Herstellers in den Vektor pBad102/D-TOPO kloniert (Abbildung 57).

Das neu entstandene Plasmid (pBAD/D-TOPO+*bal*) enthält stromaufwärts des klonierten *bal*-Gens die Sequenz des fusionierten N-terminalen Histidin-Patch-Thioredoxins (N-HP-Thio). Dieses kann bei Bedarf durch Behandlung mit Enterokinase vom synthetisierten Protein entfernt werden. Stromabwärts der *bal*-Sequenz liegen weitere fusionierte Genabschnitte, die für ein immunologisch detektierbares „V5 Epitop“ und daran anschließend einen C-terminalen His-Tag (C-His6) codieren. *E. coli* TOP10 wurde anschließend mit dem entstandenen Vektor (pBAD/D-TOPO+*bal*) transformiert und die Zellen induziert. Die erwartete Molekülmasse des Fusionsprotein (Bal_{N-HP-Thio/C-His6}) beträgt ca. 67 kDa (52 kDa Bal + 11,7 kDa N-terminales Histidin-Patch-Thioredoxin + 3 kDa C-terminales V5-Epitop mit His₆-Tag).

7.2. Überproduktion von Bal_{N-HP-Thio/C-His6}

Für die Überproduktion des Bal_{N-HP-Thio/C-His6}-Proteins wurde der Stamm *E.coli* TOP10 bei 37 °C in 20 ml LB-Medium angezogen und bei einer OD_{578nm} von 0,6 mit unterschiedlichen Arabinose-Konzentrationen (0,00002% - 0,2 %) induziert. Arabinose bindet an das AraC-Protein, welches dann als Aktivator fungiert und eine Transkription ermöglicht. Anschließend wurden die Kulturen weitere 4,5 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Zur Kontrolle wurden *E. coli* TOP10-Zellen ohne Vektor unter denselben Bedingungen angezogen. Zur Überprüfung der Überproduktion von Bal_{N-HP-Thio/C-His6} wurde jeweils 1 ml der Kultur nach der Induktion mit Arabinose entnommen und mittels SDS-PAGE auf Bildung eines 57 kDa großen Fusionsproteins analysiert. Ab einer Konzentration von 0,0002 % Arabinose war eine deutliche Überproduktion des Proteins zu beobachten (Abbildung 58). Nach Induktion, weiterem Wachstum bei 37 °C und verschiedenen Arabinose-Konzentrationen (0,0002 % - 0,2 %) zeigte sich, dass nahezu das gesamte überproduzierte Protein in unlöslicher Form vorlag (Abbildung 59).

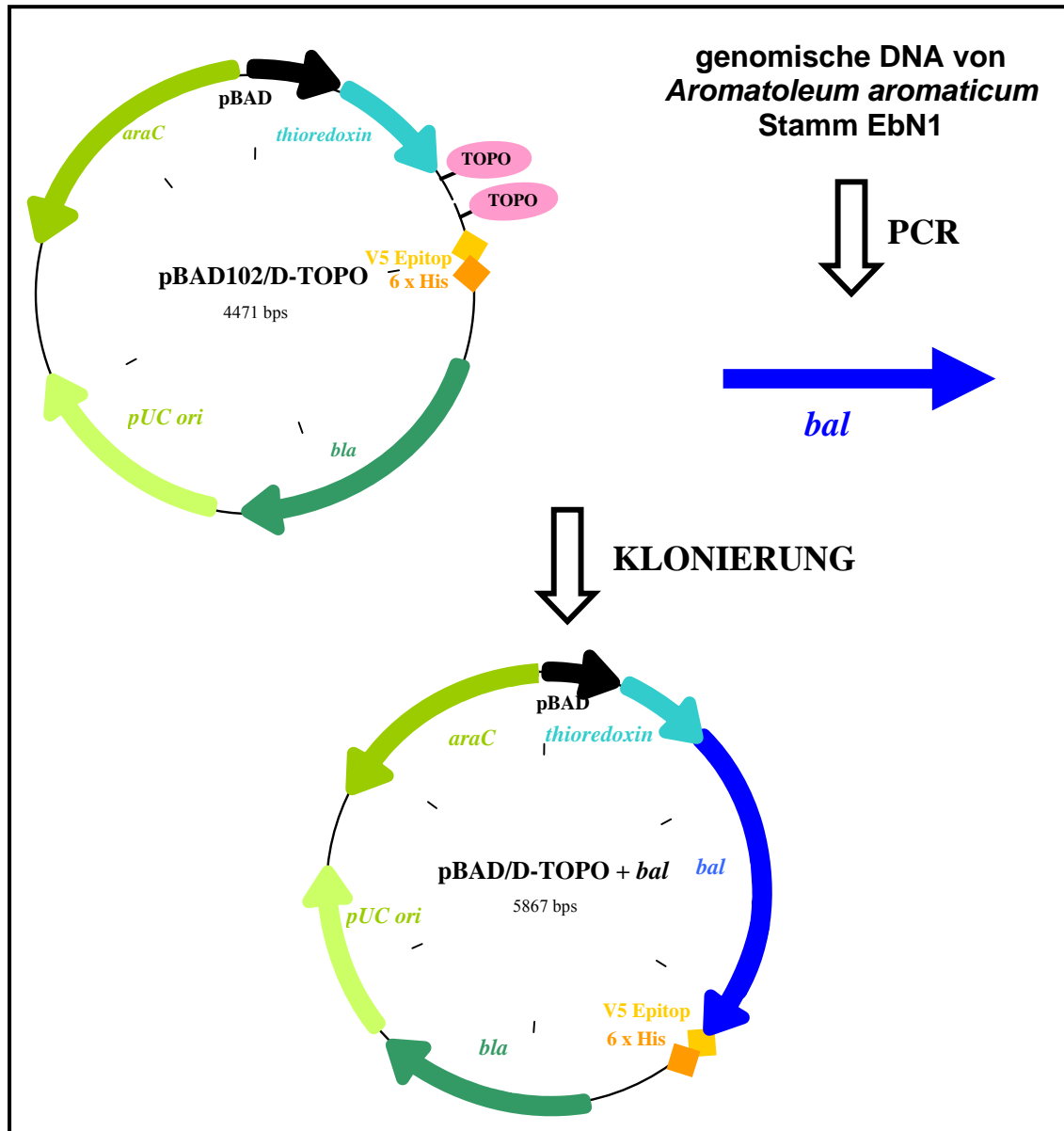


Abbildung 57: Klonierung des Gens der Benzoylacetat-CoA Ligase (*bal*) in pBAD 102/D-TOPO. Das Gen *bal* wurde aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 über PCR amplifiziert und anschließend in den Vektor pBAD102/D-TOPO kloniert. Dabei wurde eine N-terminale Fusion von Bal mit einem Histidin-Patch-Thioredoxin (*thioredoxin*) und einem C-terminalen His-Tag (6 x His) hergestellt. *bla*, Ampicillinresistenz-Gen; pBAD, Arabinose-induzierbarer Promotor; *araC*, Regulatorprotein-Gen; V5 Epitop; pUC ori, Origin pUC

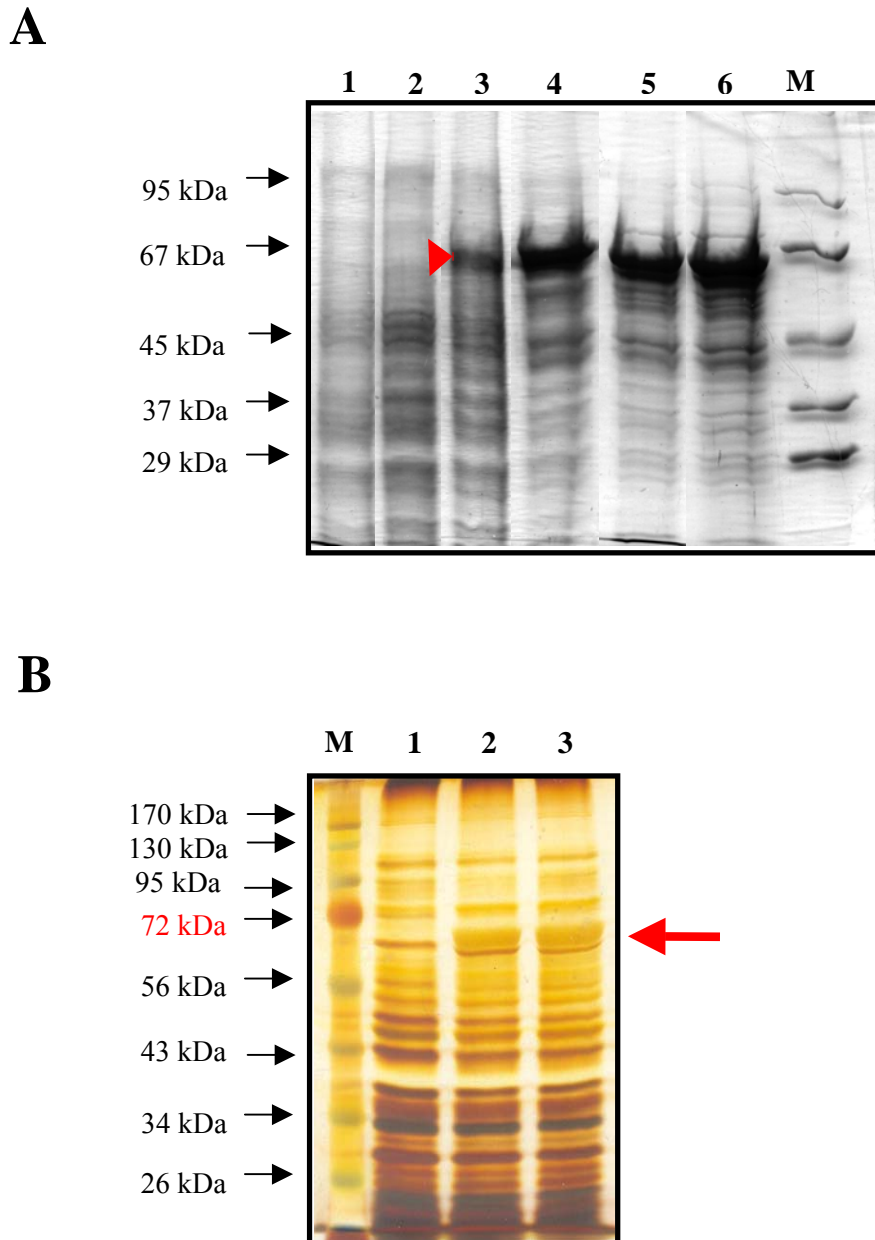


Abbildung 58: Überproduktion der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase mit N-terminalem Histidin-Patch-Thioredoxin und C-terminalem His-Tag ($Bal_{N-HP-Thio/C-His6}$) nach Induktion mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen und Wachstum bei 37 °C. Die Proben wurde auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Die roten Pfeile markieren die Protein-Bande des überproduzierten Proteins. Es wurde jeweils 20 µg Protein aufgetragen. **(A)** Überproduktion von $Bal_{N-HP-Thio/C-His6}$ nach Inkubation mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen. Molekularmassenstandard (M) und ganze Zellen von *E. coli* TOP10 ohne (Spur 1) und mit pBAD/D-TOPO+*bal* –Vektor (Spuren 2-6) nach 4,5 Stunden Induktion mit Arabinose. Die Zellen wurden mit 0,00002 % (Spur 2), 0,0002 % (Spur 3), 0,002 % (Spur 4) 0,02 % (Spur 5) und 0,2 % (Spuren 1 + 6) Arabinose induziert. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **(B)** Überproduktion von $Bal_{N-HP-Thio/C-His6}$ vor und nach Inkubation mit 0,2 % Arabinose. Gezeigt sind ganze Zellen von *E. coli* TOP10 mit pBAD/D-TOPO+*bal* –Vektor. Spur 1, vor Induktion; Spur 2, nach einer Stunde Induktion; Spur 3, nach 4 Stunden Induktion. Das Gel wurde durch Silberfärbung gefärbt.

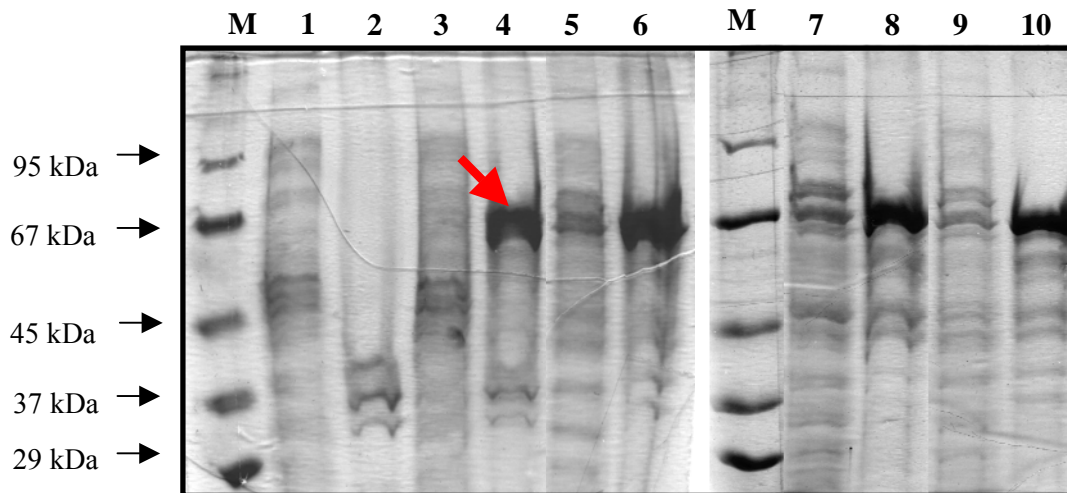


Abbildung 59: Lösliche und unlösliche Fraktionen der Zellextrakte nach Überproduktion der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase mit N-terminalem Histidin-Patch-Thioredoxin und C-terminalem His-Tag (Bal_{N-HP-Thio/C-His6}) nach Wachstum der Zellen bei 37 °C. Gezeigt sind 100000 g Pellet und Überstand des Zellextrakts nach Inkubation mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen (Spuren 1-2 und 9-10, 0,2 %; Spuren 3-4, 0,0002 %; Spuren 5-6, 0,002 %; Spuren 7-8, 0,02 %). Spuren 1,3,5,7 und 9 sind lösliche Fraktionen; Spuren 2,4,6,8 und 10 sind unlösliche Fraktionen. Auf Spuren 1-2 sind Kontroll-Zellen ohne pBAD/D-TOPO+*bal*-Vektor und auf Spuren 3-10 sind *E.coli* TOP10 Zellen mit pBAD/D-TOPO+*bal*-Vektor aufgetragen. M, Molekularmassenstandard. Die Zellen sind nach Induktion mit Arabinose weitere 4,5 Stunden bei 37 °C gewachsen. Die Proben wurde auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, welches anschließend mit Coomassie gefärbt wurde. Es wurde jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

7.3. Optimierung der Überproduktionsbedingungen von Bal_{N-HP-Thio/C-His6}

Um die Löslichkeit des Proteins zu verbessern wurden in weiteren Versuchen die Bedingungen für die Überexpression verändert. Folgende Parameter wurden variiert: 1. Die Zellen wurden bei einer OD_{578nm} von 0,6 induziert und nach Induktion bei einer niedrigeren Temperatur (20 °C) weitere 4 Stunden angezogen. 2. Die Zellen wurden auf Minimalmedium mit Glucose angezogen. Glucose verhindert eine basale Expressionsrate und erlaubt eine stärkere Regulation der Transkription. Die Induktion wurde anschließend mit zwei verschiedenen Arabinose-Konzentrationen (0,002 % und 0,2 %) gestartet. Im Vergleich zu den Zellen, die auf Vollmedium gewachsen waren, wurde bei den Zellen, die auf Minimalmedium gewachsen waren, kein überproduziertes Protein mehr gebildet (Abbildung 60). Nach Überproduktion bei tieferen Temperaturen (20°C) auf Vollmedium wurde allerdings sowohl nach Induktion mit 0,2 % Arabinose, als auch nach Induktion mit 0,002 % Arabinose ein Teil der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase als lösliches Protein gebildet (Abbildung 61).

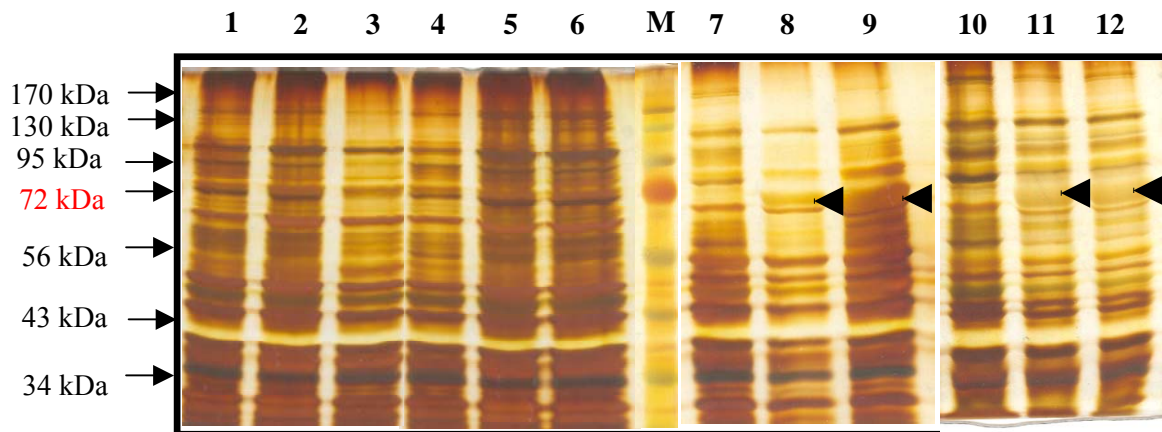


Abbildung 60: Überproduktion der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase ($Bal_{N-HP-Thio/C-His6}$) vor und nach Induktion mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen und Wachstum bei 20 °C auf Voll- und Minimalmedium. Überproduktion von $Bal_{N-HP-Thio/C-His6}$ nach Inkubation mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen. Gezeigt sind Molekularmassenstandard (M) und ganze Zellen von *E. coli* TOP10 vor und nach Induktion mit 0,2 % (Spuren 1-9) und 0,002 % Arabinose (10-12). Spuren 1,4, 7 und 10: vor Induktion; Spuren 2,5,8 und 11: nach einer Stunde Induktion; Spuren 3,6,9 und 12: nach 4 Stunden Induktion. Wachstum von *E.coli* TOP10 auf Minimalmedium (Spuren 1-6) und auf Vollmedium (Spuren 7-12). Die schwarzen Pfeile markieren die Protein-Bande des überproduzierten Proteins. Die Proben wurde auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, welches anschließend mit Silberfärbung gefärbt wurde. Es wurde jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

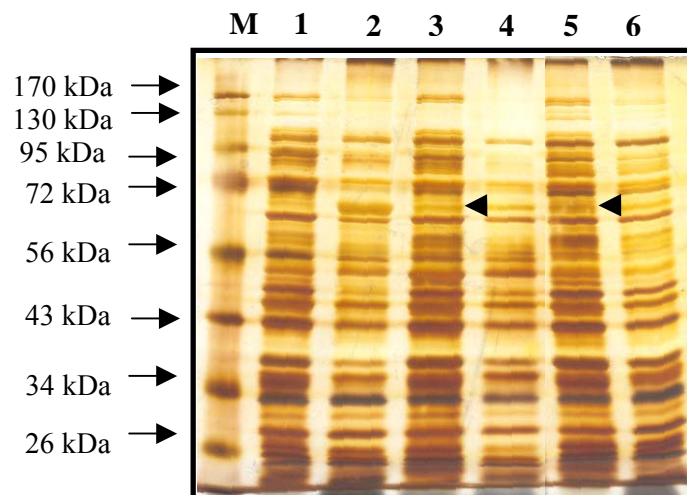


Abbildung 61: Lösliche und unlösliche Fraktionen der Überproduktion der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase ($Bal_{N-HP-Thio/C-His6}$) nach Induktion mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen und Wachstum auf Vollmedium. Gezeigt sind Molekularmassenstandard (M) und 100000 g Pellet und Überstand des Zellextrakts nach Inkubation mit verschiedenen Arabinose-Konzentrationen (Spuren 1-4 , 0,2 %; Spuren 3-4, 0,0002 %). Spuren 1,3 und 5 sind lösliche Fraktionen; Spuren 2, 4 und 6 sind unlösliche Fraktionen. Die Zellen sind nach der Induktion bei 37 °C (Spuren 1+2) und bei 20 °C (Spuren 3-6) gewachsen. Die schwarzen Pfeile markieren die Bande der löslichen rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase. Die Proben wurde auf einem 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, welches anschließend mit Silberfärbung gefärbt wurde. Es wurde jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

7.4. Aktivität der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase

Die Aktivität der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase konnte erwartungsgemäß im Extrakt aus *E. coli* TOP10-Zellen wegen störender Hintergrund-Aktivitäten für den Enzymtest (z. B. NADH-Oxidase) nicht bestimmt werden, die bei *E. coli*-Extrakten immer sehr hoch sind. Durch eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat können aber CoA-Ligasen meist so angereichert werden, dass Aktivitäten messbar sind. Deshalb wurden diejenigen Extrakte, in denen lösliche rekombinante Benzoylacetat-CoA Ligase nachgewiesen wurde (Ergebnisse 7.3.) durch Ammoniumsulfat-Fällung fraktioniert. In der Fraktion zwischen 33 % und 60 %-Ammoniumsulfat-Sättigung wurde Enzymaktivität nachgewiesen, die nach Dialyse gegen Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) über Nacht weiter anstieg. Die Aktivitäten der Benzoylacetat-CoA Ligase im Dialysat betrugen ca. 3,0 $\mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$ (Tabelle 34). Im Vergleich zu den spezifischen Aktivitäten der entsprechenden Fraktionen vor der Dialyse waren diese gegenüber den Extrakten 5,5 bis 5,9-fach angereichert.

Tabelle 34: Spezifische Aktivitäten der rekombinanten Benzoylacetat-CoA Ligase. Gezeigt sind spezifische Aktivitäten von Extrakten nach Ammoniumsulfat-Fällung der Extrakte, deren Zellen mit 0,002 % Arabinose (Extrakt 1) und 0,2 % Arabinose (Extrakt 2) induziert worden waren. nb, nicht bestimmbar.

Extrakt 1	Spezifische Aktivität $\mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$	Anreicherung (-fach)
Überstand nach 33 % (NH ₄) ₂ SO ₄	nb	
Überstand nach 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0,51	1
Dialysat des Überstands nach 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	3,02	5,9
Extrakt 2	Spezifische Aktivität $\mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$	Anreicherung (-fach)
Überstand nach 33 % (NH ₄) ₂ SO ₄	nb	
Überstand nach 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0,51	1
Dialysat des Überstands nach 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	2,85	5,6

Gegenüber der spezifischen Aktivität des Enzyms, die in Ethylbenzol-abbauenden Zellen von Stamm EbN1 gemessen wird, zeigt die gemessene Aktivität eine 20-fache Anreicherung des Enzyms an. Zu-sammen mit den eingefügten Affinitäts-Tags sollte die Reinigung des Enzyms deshalb nun möglich sein.

DISKUSSION

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist das initiale Schlüsselenzym des anaeroben Ethylbenzol Abbauweges in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1. Sie ist ein Molybdänenzym, das zur Familie der DMSO-Reduktasen gehört und große Sequenz-Ähnlichkeiten zur Selenatreduktase von *Thauera selenatis*, Dimethylsulfid-Dehydrogenase von *Rhodovulum sulfidophilum*, (Per)Chlorat-reduktasen und membrangebundenen, respiratorischen Nitratreduktasen zeigt (Rabus *et al.*, 2002; Szaleniec *et al.*, 2003). Das Enzym katalysiert eine bisher einzigartige Redoxreaktion, die Sauerstoff-unabhängige und stereospezifische Oxidation eines aromatischen Kohlenwasserstoffes. Diese Reaktion umfasst die Hydroxylierung von Ethylbenzol zu (*S*)-1-Phenylethanol (Kniemeyer *et al.*, 2001a).

Innerhalb dieser Arbeit wurde das Molybdänenzym unter anaeroben Bedingungen kristallisiert und dessen Struktur bei einer Auflösung von 1,88 Å gelöst. Des weiteren wurden neue Erkenntnisse zur Funktion dieses Molybdoenzyms gewonnen und ein erster Mechanismus vorgeschlagen.

1. Die Struktur der Ethylbenzol Dehydrogenase

Die oligomere Architektur der Untereinheiten der Ethylbenzol Dehydrogenase ähnelt einer Zwergenmütze (Abbildung 9), wobei sich die einzelnen drei Untereinheiten (Alpha, Beta und Gamma) voneinander unterscheiden.

1. 1. Die Alpha Untereinheit

Das Polypeptid der Alpha-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase startet an Position 55 (Kniemeyer *et al.*, 2001a), nachdem ein TAT (Twin-Arginin-Transport)-Signalpeptid (Rabus *et al.*, 2002) entfernt wurde und ist in der Kristallstruktur von Glu65 bis zum C-terminalen Ala976 sichtbar. Die Reste 65-74 binden an die Beta-Untereinheit, während die Reste 55-64 offenbar frei beweglich sind und deshalb ungeordnet im Kristall vorliegen. Die Alpha-Untereinheit beherbergt das aktive Zentrum mit dem Molybdän-bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (Mo-*bis*MGD)-Kofaktor, dessen chemische Struktur in Abbildung 62 gezeigt ist.

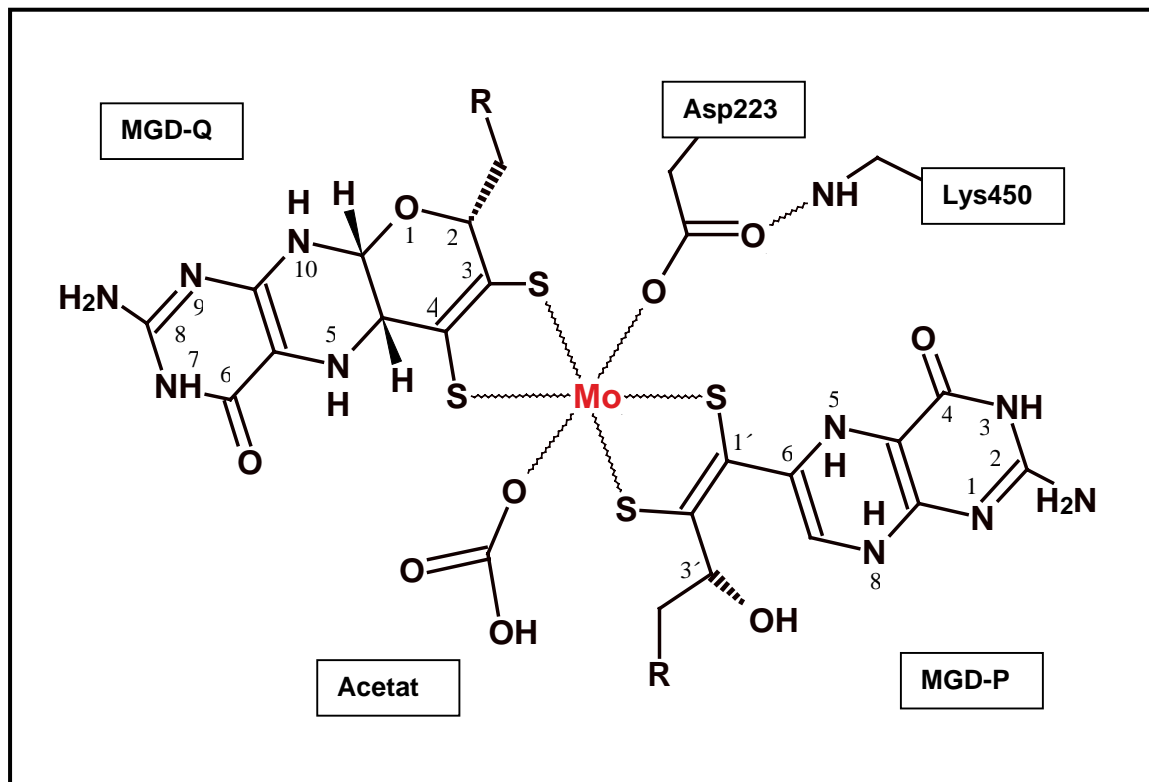


Abbildung 62: Die chemische Struktur des Kofaktors Molybdän-bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (Mo-bisMGD) der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Nummerierung ist laut der relevanten Literatur angegeben (Fischer *et al.*, 1998). Bemerkenswert ist, dass der Pyranring des MGD-P offen ist, so wie das entsprechende MGD einer der zwei bekannten Nitratreduktase (NarG)-Strukturen (Tabelle 28). Die Ringöffnung entspannt die geometrischen Erfordernisse. Im Gegensatz dazu ist MGD-Q, welches wahrscheinlich den Elektronentransport erleichtert, geschlossen. Der beobachtete fünfte (Asp223-Oδ2) und sechste (Acetat) Ligand des zentralen Molybdän (in rot dargestellt) sind gezeigt. Es sollte angemerkt werden, dass die exakte Struktur des Piperazinrings des offenen MGD-P nicht durch die Elektronendichte ableitbar ist. Alternativ zur gezeigten Struktur ist denkbar, dass er in einer tautomeren Struktur mit einer Doppelbindung zwischen C7 und N8 vorliegt, oder sogar, dass der Piperazinring durch das nahegelegene Molybdän-Redoxzentrum zu einem aromatischen System weiter oxidiert wird.

Die zwei MGD-Moleküle unterscheiden sich insofern voneinander, dass das eine Molekül einen geschlossenen Pyranring aufweist, wohingegen der Pyranring des anderen Moleküls offen ist. Das Molybdänatom wird, wie bereits bekannt (Hille, 2002), durch zwei Dithiol-Gruppen gehalten. Die Struktur um das Molybdän-Ion ist in Abbildung 62 dargestellt. Die Elektronendichte zeigt klar den offenen Pyranring von MGD-P und den geschlossenen Ring von MGD-Q (Abbildung 63). Dieses offene MGD Molekül wurde auch bei einer der beiden publizierten NarG Strukturen beobachtet und kann bei der anderen nicht ausgeschlossen werden (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.* 2004). Die offene Form des MGD-P wird durch Wasserstoffbindungen zwischen der 3'Hydroxylgruppe und His855-Nδ, wie auch Arg612-Nζ stabilisiert. Der entsprechende Ring-Sauerstoff des geschlossenen MGD-Q befindet sich in einer weniger polaren Umgebung.

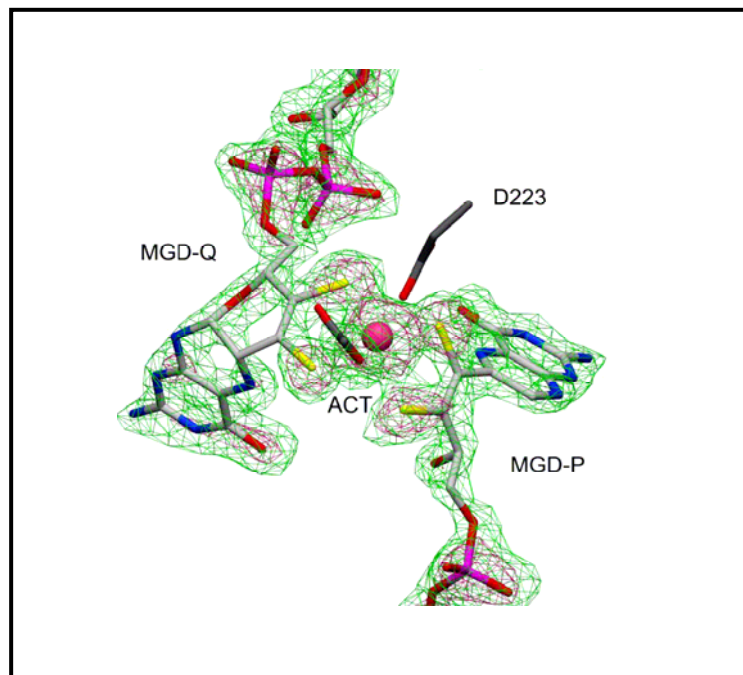


Abbildung 63: Struktur des aktiven Zentrums um das Molybdänion mit der endgültigen (2Fo-Fc)-Elektronendichte bei Umrissbereichen von 2.5 σ und 5.0 σ . Die Elektronendichte ist konsistent mit der Stereochemie, die in Abbildung 62 dargestellt wurde. Sie zeigt, dass keine oxo-Gruppe am Molybdänion ligiert sein kann, was für das Vorliegen des Enzyms im reduzierten Zustand mit Molybdän im Mo (IV) Zustand spricht.

Die offene Form des MGD ist leichter in eine Polypeptidfalte anzupassen als eine geschlossene. Die chemische Konformation am Ringatom C6 und C7 des MGD-P ist bis jetzt noch nicht endgültig sicher. Jedoch spricht die Elektronendichte in Abbildung 63 für ein flaches sp^2 Zentrum am C6, welches das langgeformte Tautomer in Abbildung 2 begünstigen würde. Dieses Ergebnis widerspricht dem beschriebenen tetrahedralen C6 Atom des offenen MGD-P-Kofaktors von NarG (Bertero *et al.*, 2003). Es sollte erwähnt werden, dass die gefundene Elektronendichte auch mit der Anwesenheit einer dritten Doppelbindung im Piperazinring vereinbar wäre, mit der sich ein aromatischer Ring ergäbe. Eine solche Umformung des Rings wäre durchaus vorstellbar, z. B. durch Oxidation durch das Molybdänzentrum. Die Konformationen der chiralen Zentren an den C4a und C10a Atomen des geschlossenen MGD-Q wurden von der Elektronendichte abgeleitet (Abbildung 62). Zusätzlich enthält die Alpha-Untereinheit das erste [4Fe-4S]-Zentrum des Enzyms, das als FS0 bezeichnet ist. Der MGD-Q Kofaktor liegt nahe bei diesem ersten FS0 Zentrum, während der MGD-P Kofaktor weit davon entfernt ist, was auf eine Beteiligung des ersteren, nicht aber des letzteren am Elektronentransport schließen lässt.

Die lange Alphakette aus 912 Strukturresten wird in vier Domänen eingeteilt (Boyington *et al.*, 1997; Schindelin *et al.*, 1996): Domäne I (Reste 65-138, 659-676 und 737-770) bindet das Cluster FS0, Domäne II (146-222, 486-652 und 687-728) bindet den offenen MGD-P-Kofaktor, Domäne

III (226-468 and 777-824) bindet den geschlossenen MGD-Q, und Domäne IV (843-976). Die Domänen sind in verschiedenen Farben in Abbildung 64 gezeigt. Da diese die Domänen-Zuordnung mehr den räumlichen Gegebenheiten folgt als der Position entlang der Kette, besteht eine Domäne aus bis zu drei Segmenten der Polypeptidkette. Diese Domänen sind nicht durch Brechen der Polypeptidkette abteilbar und stellen deshalb keine gewöhnlichen Bausteine dar, die von Protein zu Protein während der Evolution übertragen worden sind. Zwei vergleichsweise kleine $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ Rossmann Motive sind jedoch innerhalb der Domänen II und III zu finden (Abbildung 64). Sie binden die zwei MGD-Dinukleotide in der üblichen beobachteten Geometrie (Schulz, 1992).

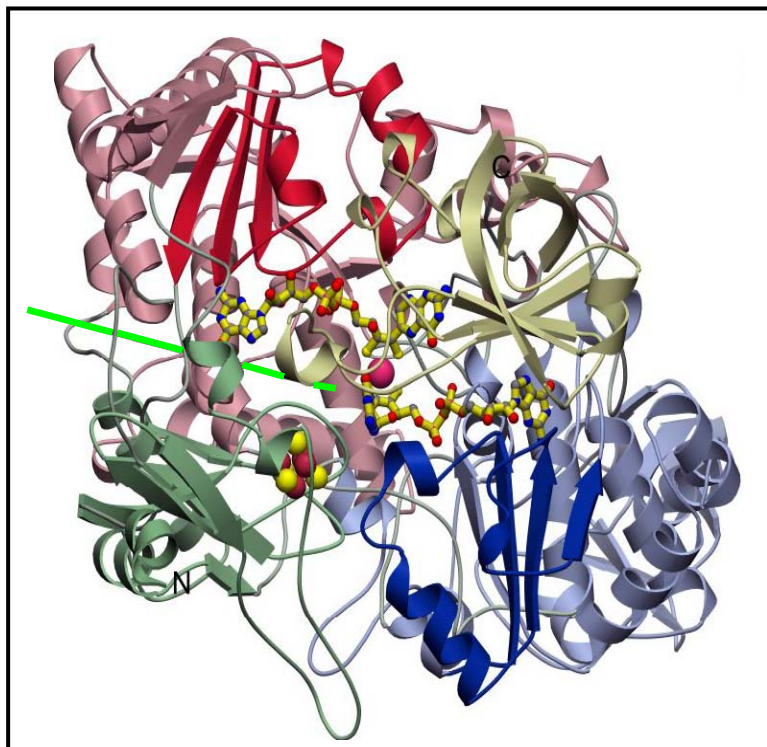


Abbildung 64: Streifendarstellung der Alpha-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase mit dem Mo-bisMGD und dem Eisen-Schwefel Zentrum FS0. Die Tasche ins aktive Zentrum ist durch eine hellgrüne Linie dargestellt. Die Kettenregionen, die in vorangegangenen Publikationen über Mitglieder der DMSO Familie als die Domänen I bis IV bezeichnet wurden (Boyington *et al.*, 1997; Schindelin *et al.*, 1996), sind entsprechend in grün, rot, blau und violett dargestellt. Die Segmente, welche die Domänen darstellen, liegen räumlich nahe zusammen, sind aber entlang der Kette verstreut. Die Rossmann-Motive $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, welche die zwei Guanin-Reste des Mo-bisMGD binden, sind durch dunkle Farben hervorgehoben.

Eine tiefe Tasche erstreckt sich ausgehend von der Öffnung der „Zwergenmütze“ bis zum aktiven Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase im Innern der Alpha-Untereinheit (Abbildung 9). Da die Tasche mit vorwiegend nichtpolaren Resten ausgekleidet ist, die nur wenige kristallographisch definierte Wassermoleküle enthalten, eignet sie sich sehr gut für den Durchtritt von nichtpolaren Substraten wie Ethylbenzol. Das [4Fe-4S]-Zentrum FS0 der Alpha-Untereinheit ist mit Ausnahme des vierten Liganden, bei dem ein Cystein durch ein Histidin ersetzt ist, ein gewöhnliches [4Fe-

4S]-Zentrum. Es liegt in einer ausreichenden Entfernung für den Elektronentransfer zum Pterin-Rest des geschlossenen MGD-Q. Dieses FS0-Zentrum ist innerhalb der Typ II Subfamilie der DMSO Reduktase konserviert (Abbildung 77).

Die Alpha-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase mit ihrem Mo-*bis*MGD-Kofaktor zeigt Sequenzähnlichkeit zu sieben anderen Enzymen der DMSO Familie (Tabelle 28). Das nächstverwandte Enzym mit bekannter Struktur ist die Nitratreduktase Untereinheit NarG (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004), die 723 äquivalente C α Atome innerhalb des gewöhnlichen 3 Å Ausschlusskriteriums zeigt, jedoch eine mehr als 300 Reste längere Kette besitzt (Tabelle 28). Diese beiden Enzyme sind bislang die einzigen strukturell bekannten Mitglieder der Subfamilie II, welche durch ein Aspartat als Molybdän-Ligand definiert ist (Abbildung 65, McDevitt *et al.*, 2002). Darüber hinaus haben NarG und Ethylbenzol Dehydrogenase auch ein offenes MGD-P, so dass dies vermutlich ein weiteres Kriterium der Enzyme der Subfamilie II darstellt. Weitere homologe Strukturen sind die der weiteren Enzyme der DMSO Reduktase-Familie, z. B. DMSO Reduktasen (Schindelin *et al.*, 1996; McAlpine *et al.*, 1998), die Pyrrogallol-Phloroglukinol Transhydroxylase (Messerschmidt *et al.*, 2004), die Formiat Dehydrogenasen (Boyington *et al.*, 1997; Jormakka *et al.*, 2002), die assimilatorische Nitratreduktase NapA (Dias *et al.*, 1999, Arnoux *et al.*, 2003) und die Arsenit Oxidase (Ellis *et al.*, 2001). Diese Strukturen zeigen 598 bis 446 äquivalente C α Atome zur Ethylbenzol Dehydrogenase innerhalb des Ausschlusskriteriums. Diese Werte zeigen aussagekräftige evolutionäre Beziehungen all dieser Enzyme an, besonders im Hinblick auf die verschränkte Kettenfaltung der Alpha-Untereinheiten.

Typ I	
NarB_Nostoc	MYGSGQFQTEDYYI-----AQKLMKGCLGSNNFDANSRLCMSSAVSGYI
FdhH_Ec	TTGSSRG TGNETNYVMQ----KFARAVIGTNNVDCCARV--UHGPSVAGLH
FdhN_Ec	NRWLSTGMLCASGASNETGMLTQKFARSLGMLAVDNQARV--UHGPTVASLA
NapA_Salm	MFGSGQWTIWEGYA-----AAKLFKAGFRSNNIDPNARECMASAVVGFM
NasA_Kleb	FYASGQLLTEDYYA-----ANKLMKGFIGAANIDTNSRLCMSSAVTGYK
Typ II	
EbdA_EbN1	GFILDAPHVHAGSIA-WGA-GFRMTYLMDGVSPDINVDIGDITYM---GAF
EbdA2EbN1	SFILDSPHVHAGSVANS--GYRMTYLLDGVSPDNNVDIGDITYS---GAF
EbdA_EB1	GFILDAPHVHAGSIA-WGA-GFRMTYLMDGVSPDINVDIGDITYM---GAF
SerA_Thau	MPKRPFVAVITSA--G----YSRLANLIGAIPDVSSMTGDLYP---GIQ
DdhA_Rhodo	THTGSGNMSMMR-M----AAPYRFASLVGGVQLDIFTDVGDINT---GAH
ClrA_Ideo	IPKRPFVAVITNT-----A-YTRMTKLLGAISPDATSMTGDLTYT---GIQ
PcrA_Decl	VYSPLPGTAPVS-F---SAGHRFAHYIGAHTHTFFDWYSDHPT---GQT
Nar_Ha	GFTPIPAMSPVS-F----ASGSRLVNLLGGVSHSFYDWYSDLPP---GQP
Nar_Hf	GFTPIPAMSPVS-F----ASGSRLVNLLGGVSHSFYDWYSDLPP---GQP
Nar_Aero	GFTPIPAMSPVS-Y----ASGARFIELIGGSMGSFYDWYADLPP---ASP
Nar_Pyro	GFTPIPAMSPVS-Y----ASGARFIELIGGAMGSFYDWYADLPP---ASP
NarG_Ec	GFSPIPAMSMVS-Y----ASGARYLSLIGGTCLSFYDWYCDLPP---ASP
Typ III	
DmsA_Ec	LNyGTGTLGGTMTRS WPPGNTLVARLMNCCGGYLNHYGDYS SQAIAEGLN
BisC_Ec	AGSYGWR SNGVLHKAS----TLLQRYMALAGGYTGHLGDYS STGAAQAIMP
DorA_Rhodo	GGSYGWKSPGR LHN----CTLLRRMLTLAGGYVNGAGDYS STGAAQVIMP
TorA_Ec	TASGWQSTGMFHNAS----GMLAKAIALHGNSVGTGGDYS STGAAQVILP

Abbildung 65: Multipler Sequenzvergleich von Proteinsequenzen der Molybdän-haltigen Untereinheiten von Enzymen der DMSO Reduktase Familie. Für die Proteine wurden folgende Abkürzungen verwendet: DorA, Dimethylsulfoxid Reduktase; TorA, Trimethylamin-N-oxide Reduktase; BisC, Biotin Sulphoxid Reduktase; NasA assimilatorische Nitratreduktase; NapA, periplasmtische Nitratreduktase; Fdh, Format Dehydrogenase; PhsA, Thiosulphatreduktase; PsrA, Polysulfidreduktase; DmsA Dimethylsulfoxidreduktase; NarG, membrangebundene, respiratorische Nitratreduktase; Nar, periplasmatische Nitratreduktase; EbdA, Ethylbenzol Dehydrogenase; EbdA2, Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnliches Enzym; PcrA Perchloratreduktase; ClrA, Chloratreduktase; SerA, Selenatreduktase; DdhA, Dimethylsulfid Dehydrogenase. Abkürzungen für die Organismen sind: Rhodo, *Rhodovulum sulfidophilum*; E.coli, *Escherichia coli*; Thau, *Thauera selenatis*; Woli, *Wolinella succinogenes*; Pyro, *Pyrobaculum aerophilum str. IM2*; Ideo, *Ideonella dechloratans*; Ha, *Haloarcula marismortui*; Hf, *Haloferax mediterranei*; Ap, *Aeropyrum pernix K1*; Dech, *Dechloromonas aromatica*, EbN1; *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1; EB1, *Aromatoleum aromaticum* Stamm EB1. Die konservierten Molybdän Liganden C (Cystein) bzw. U (Selenocystein), der Subfamilie I, D (Aspartat), der Subfamilie II und S (Serin), der Subfamilie III sind durch einen Rahmen hervorgehoben.

1.2. Die Beta-Untereinheit

Der aufgelöste Strukturteil dieser Untereinheit umfasst die Reste 16-352 (Abbildung 66). Die 15 N-terminalen Reste sind ungeordnet. Beide ungeordneten N-Termini der Alpha- und Beta-Untereinheiten sind interessanterweise in derselben Region des Enzyms lokalisiert und weisen zwischen den C α Atomen der ersten sichtbaren Aminosäuren eine Entfernung von 19 Å auf. Es ist vorstellbar, dass diese beweglichen Kettenenden für die Verankerung der Ethylbenzol Dehydrogenase in einer bestimmten zellulären Region wichtig sind.

Die Beta-Untereinheit enthält vier der fünf Eisen-Schwefel Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase. Zusammen mit dem FS0 der Alpha-Untereinheit, sind diese Zentren in einer „W“-Form angeordnet (Abbildung 9). Die vier Zentren der Beta-Untereinheit können als zwei Paare betrachtet werden, die durch eine zweifache Pseudo-Achse miteinander in Beziehung stehen. Die Kettenfaltung jedes einzelnen Teils ist nahe verwandt zum Sieben-Eisen-Typ der Ferredoxine (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2001). Die Beta-Untereinheit kann somit eigentlich als ein N-terminales Ferredoxin (grün) gefolgt von dessen Kopie (rot) betrachtet werden, die am Strang β 11 startet (Abbildung 66).

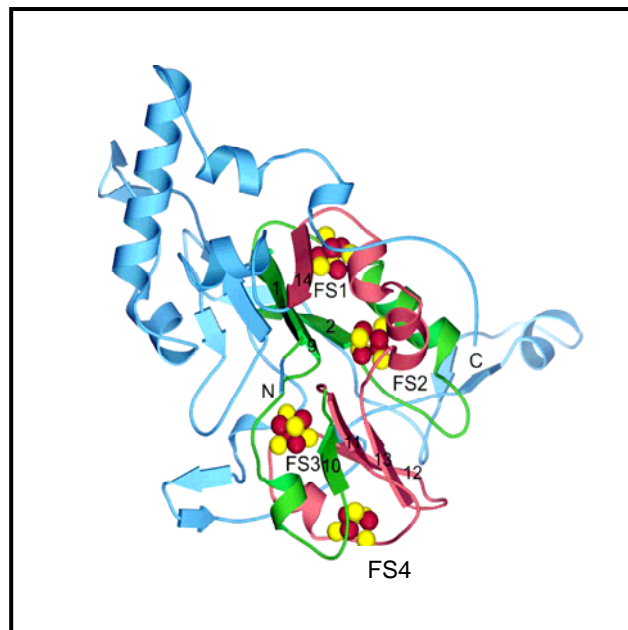


Abbildung 66: Streifendarstellung der Beta Untereinheit mit ihren Eisen-Schwefel Zentren. Die vier Zentren sind an zwei Ferredoxin-ähnliche Motive gebunden. Das Ferredoxin (grün) ist N-terminal, gefolgt von einer Kopie (rot). Die zwei Teile greifen durch einen Austausch von Strang β 10 und β 4 zusammen mit den vorangehenden Aminosäuren dicht ineinander. Die drei [4Fe-4S]-Zentren FS1, FS2 und FS3, wie auch das [3Fe-4Fe] Zentrum FS4 sind als Kugelmodell gezeigt. Das Polypeptid ist in blau dargestellt.

Es kann angenommen werden, dass die Untereinheit während der Evolution durch eine Verdopplung eines Ferredoxin-ähnlichen Elektronenüberträgers entstanden ist und dann ein Austausch der Stränge $\beta 10$ (grün) und $\beta 14$ (rot) zusammen mit ihren vorangehenden Peptiden folgte. Eine Zeichnung dieser Tandem-Anordnung ist in Abbildung 67A gezeigt. Die enge räumliche Beziehung zwischen den zwei Teilen der Beta-Untereinheit und Ferredoxin wird durch die Überlagerungsabbildung 67B gezeigt. FS4 ist ein $[3\text{Fe-4S}]$ -Zentrum, welches wie das analoge Zentrum der Sieben-Eisen-Typ- Ferredoxine nur drei Cysteine besitzt. Die hohe Ähnlichkeit der Polypeptide in der Umgebung der Fe-S-Zentren könnte einen physikalischen Hintergrund haben. Eine nähere Betrachtung zeigt, dass die in der beobachteten Peptid-Konformation eine ungewöhnlich große Anzahl von Amidgruppen auf die Fe-S-Zentren ausgerichtet sind und damit deren negative Nettoladung stabilisieren.

Vergleicht man die Struktur der Beta-Untereinheit mit anderen Strukturen, weisen drei Mitglieder der DMSO Reduktase eine ähnliche Beta-Untereinheit auf (Tabelle 28). Ähnlich wie bei der Alpha-Untereinheit ähnelt die Faltung der Polypeptidkette am meisten jener der Beta-Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase NarH (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004), wobei diese wiederum eine ca. 150 Aminosäuren längere Polypeptidkette besitzt. Die zwei Ketten zeigen innerhalb der gebräuchlichen 3 \AA Ausschlusskriteriums 290 strukturell entsprechende $\text{C}\alpha$ Atome (Tabelle 28). Dieser Teil hat 46 % Sequenzähnlichkeit und die Positionen der Redoxzentren weichen weniger als 0.5 \AA ab, was auf eine nahe Verwandtschaft hinweist. In beiden Enzymen sind alle Eisenatome der vier Zentren durch konservierte Cysteine koordiniert. Deshalb wurde erwartet, dass auch die Redoxpotentiale der vier Redoxzentren der Ethylbenzol Dehydrogenase ähnlich zu denen von NarH sein sollten. Die Beta-Untereinheiten der Pyrogallol-Phloroglucinol Transhydroxylase (Messerschmidt *et al.*, 2004) und Formiat Dehydrogenase-N (Jormakka *et al.*, 2002) sind ebenfalls zu der Ethylbenzol Dehydrogenase Beta-Untereinheit verwandt. Sie zeigen 165 entsprechende $\text{C}\alpha$ Atome bei 32 % Sequenzähnlichkeit, bzw. 161 Entsprechungen bei 30 % Sequenzähnlichkeit, was auf eine bereits größere evolutionäre Distanz hindeutet (Tabelle 28).

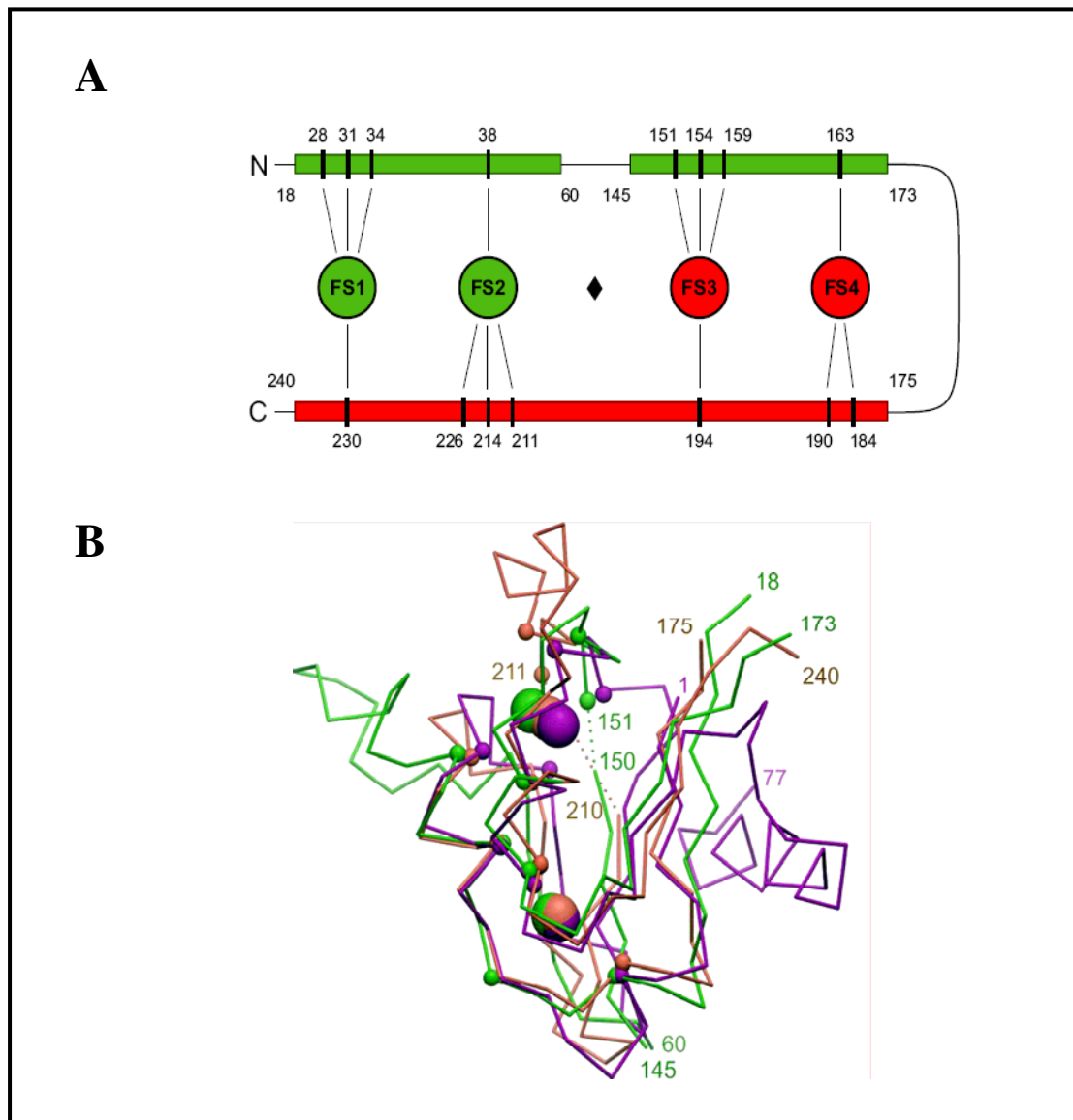


Abbildung 67: Die Beziehung zwischen der Beta-Untereinheit und dem Ferredoxin. (A) Zeichnung der Polypeptidkette der Beta-Untereinheit mit ihren vier Eisen-Schwefel Zentren. Es wurden dieselben Farben wie in Abbildung 66 verwendet. Die Beta-Untereinheit kann als zwei hintereinander gelegene Kopien eines Ferredoxins betrachtet werden, die entlang der Kette Teile ausgetauscht haben, eine große Insertion nach Position 60 aufweisen und 112 zusätzliche Reste nach Position 240 tragen. (B) Darstellung eines sieben-Eisen-Typ Ferredoxins (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2001) (violett) mit Polypeptidketten-Segmenten der Beta-Untereinheit (rot und grün). Für die Beta-Untereinheit wurden dieselben Farben wie in Abbildung 66 verwendet. Die Überlagerung der Polypeptidkette bringt die Eisen-Schwefel-Zentren (große Kugeln, FS2 und FS3 an der Spitze, FS1 und FS4 unten) nahe zusammen. Dasselbe gilt auch für die Cysteine, welche die Zentren festhalten, die C α Atome, die durch kleine Kugeln dargestellt sind.

1.3. Die Gamma-Untereinheit

Die Gamma-Untereinheit besteht aus einer einzelnen Domäne mit 214 Resten, die hauptsächlich ein antiparalleles Beta-Faltblatt-Sandwich bildet. Alle Reste nehmen eine definierte Konformation ein. Die Faltblätter bilden eine halbmondförmige Struktur, die ein gebundenes Häm *b* einhüllt (Abbildung 68). Das Häm ist bis auf seine zwei Propionat-Seitenketten, die Wasserstoffbrückenbindungen mit Lys185-N ζ und His187-N ϵ der Beta-Untereinheit bilden, ganz umhüllt von vier großen Loops mit den Resten 34-52, 98-115, 130-140 und 190-201. Das Häm *b* liegt festverpackt in seiner Bindungstasche und lässt keinen Platz für die Bindung irgendwelcher anderer Moleküle.

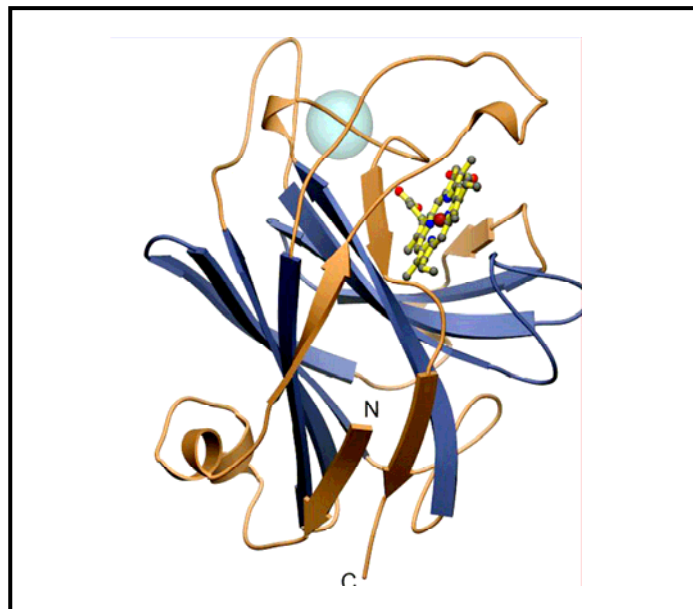


Abbildung 68: Streifendarstellung der Gamma-Untereinheit mit dem Kofaktor Häm *b*. Die Faltung der Beta-Faltblätter ähnelt der der V_H-Domänen von Antikörpern (Tabelle 28). Die entsprechenden Kettenteile sind in violett dargestellt. Die Lage der Antigen-Bindestelle bei den strukturell ähnlichen V_H-Domänen ist durch eine Kugel dargestellt.

Im Kristall ist das Häm planar und das Eisen liegt exakt in der Ebene der vier Pyrrolringe. Die zwei axialen Liganden sind Met108-S δ mit einer Fe-S Entfernung von 2.3 Å und Lys201-N ζ mit einer Fe-N Entfernung von 2.0 Å (Abbildung 69). Das Mittelpunkt-Redoxpotential des Häm *b* ist extrem hoch und beträgt $+256 \pm 0,7$ mV (Tabelle 33). Dieses kann erklärt werden durch die nichtpolare Häm-Bindetasche und durch die zwei axialen Liganden, die das ungeladene Eisen(II)-Häm gegenüber dem geladenen Eisen (III)-Häm begünstigen. Eine Suche gegen die Protein Datenbank ergab, dass EbdC das erste bekannte Häm-Protein mit axialen Methionin und Lysin Liganden ist. Im Vergleich dazu hat das Häm der Formiat Dehydrogenase-N (Jormakka *et al.*, 2002) Met-S δ und His-N δ Atome als axiale Liganden und zeigt ein Mittelpunkt Redoxpotential von +169 mV. Das in Hinsicht auf die Ethylbenzol Dehydrogenase niedrigere Mittenpotential

stimmt mit dem geringeren nukleophilen Verhalten von Lysin in Bezug zu Histidin überein, welches die Stabilität des Fe^{3+} Zustands vermindert.

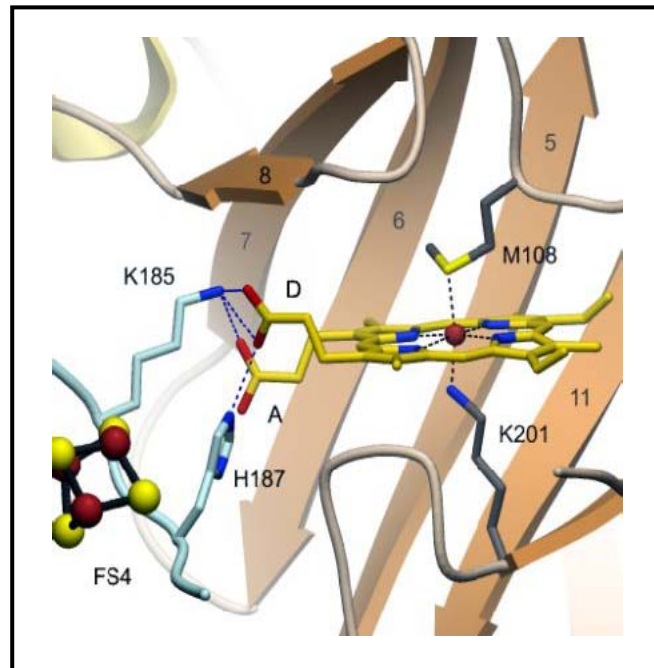


Abbildung 69: Darstellung der Häm-Bindestelle. Die Beta- und Gamma-Untereinheit sind jeweils in hellblau und orange dargestellt. Sekundäre Strukturelemente in der Gamma-Untereinheit und Seitenketten, die mit dem Häm *b* interagieren sind bezeichnet. Die Häm 13- und 17-Propionatgruppen sind jeweils als A und D benannt. Das Häm-Eisen wird durch die axialen Liganden Met108-Sδ und Lys201-Nε in der Gamma-Untereinheit koordiniert. Lys185 und His187 der Beta-Untereinheit befinden sich in nächster Nachbarschaft zum [3Fe-4S]-Zentrum FS4 und sind direkt an die Häm-Propionat-Seitenketten durch Wasserstoffbrücken verbunden. Diese Seitenketten bilden eine Elektronentransportkette zwischen den zwei Redoxzentren.

Eine Suche nach strukturellen Homologien ergab, dass die Gamma-Untereinheit keinen Gegenpart in den strukturell bekannten Mitgliedern der DMSO Familie besitzt. Jedoch ist sie in Bezug auf die Faltung der Polypeptidkette und der Lage der aktiven Zentren verwandt mit der Kohlenhydrat-Bindedomäne C2 einer Xylanase (Notenboom *et al.*, 2001), mit der Cytochrom Domäne einer extrazellulären Flavocytochrom-Cellobiose-Dehydrogenase (Hallberg *et al.*, 2000), und weiter entfernt mit der V_H Domäne von Antikörpern (Tabelle 28). Die Position des Häm *b* deckt sich genau mit der Substratbindestelle der Xylanase bzw. der Häm-Bindestelle der Dehydrogenase. In Hinblick auf die gut passenden Kofaktoren und Substrat-Bindestellen, scheinen die Xylanase und die Dehydrogenase evolutionär verwandt zu sein. Interessanterweise ist die Antigen-Binde-stelle der V_H -Domäne, die in Abbildung 68 gekennzeichnet ist, in einer ähnlichen Position, sobald sie dem Beta-Faltblatt-Sandwich zugeordnet wird. Jedoch ist die Verwandtschaft mit V_H -Domänen distanzierter und mag vielleicht eher physikalischer als evolutionärer Natur sein. Ein physikalischer Vorzug ist vorstellbar, da dieser Beta-Faltblatt-Sandwich Typ eine eher einfache Faltung hat und auch sehr gewöhnlich ist.

Die Gamma-Untereinheit der respiratorischen Nitratreduktase NarI von *Escherichia coli* (Bertero *et al.*, 2003) ist in die Cytoplasmamembran integriert und unterscheidet sich vollständig von EbdC. Die entsprechenden Sequenzen der Gamma-Untereinheiten der Nitratreduktasen extremer halo- und thermophiler Archaea (Yoshimatsu *et al.*, 1999; Lledó *et al.*, 2004, und Accession-Nummern: BAA80288; AAL65044) und des ersten Genom-sequenzierten Anammox-Bakteriums (Strous *et al.*, 2006) zeigen jedoch Sequenzähnlichkeit mit der Gamma-Untereinheit der Ethylbenzol-Dehydrogenase (Abbildung 70).

EbdC_EbN1	121	VDGAAVQFPVNGKDTTLAF....	MGDPDN.PVNVWHWRADGRTRN.LVA
EbdC2_EbN1	89	VDGAAVLFLVEGA.PAMT....	MGAKGK.PTNAWFWKANQKSA..MEV
SerC_Thau	89	VDGVGAMFPVARGAQAVT....	MGATGR.PVNAWYWKANANEP..MEI
DdhC_Rhodo	117	ADAVAVQFPNTSSRPPIA....	MGGPDN.RVNVWYWSGATGTQE.LLA
ChlC_Ideo	122	LDGAAVEFPVNGKVATLPF....	MGDPVN.VVNVWHWRADGRTL.N.LLA
NarM_Ha	131	RDGAAIEFSESDDSVSYM....	MGTDAESPVNIWYWHPDGDRVESLAA
NarM_Hf	121	VDAAAVQVPVNTTARPPIS....	MGEHPY.PVNVWYWRADGETEE.LLA
NarM_Ap	113	PDAVAVQFPVSKAQLPYIC....	MGTVDN.PVNIIYWRAGFGAENLVAG
NarM_Pa	120	PDKVAVQFPLSSDSLPIYIC....	MGTAEQ.PVSIVLWSASGSTETLIAG
NarM_CKS	133	RDGAALMFPLGKITISPEEPFSPR	MGDRQK.PVNLWHWKAD.WEADLLAT
EbdC_EbN1	166	KGFG..TATPVPAEGLR...	STATRTRDG.....
EbdC2_EbN1	132	VAESF.TAVQRLEGKAT...	SDLKTVAQHONGE.....
SerC_Thau	131	VAEGF.SAVRRMKDKAG...	SDLKAVAQHRNGE.....
DdhC_Rhodo	161	GGAGSTTAF...ENPTVQA	NASH.....SGTGGNAT.....
ChlC_Ideo	166	KGFG..TSTPVPTEDLR...	SASVRTGDG.....
NarM_Ha	176	GSPGSLTRLD..RQPVTGA.	SEYRTGHGPPDSQ.....
NarM_Hf	166	GGPGTTTKF....EQ.....	SAVETKTAYDDGR.....
NarM_Ap	158	AGYGLNPQQR...EALGLQA	TPASPVELLPA.SAQVINATAAYKD GK...
NarM_Pa	165	SAYGMSPEH..R.EALGLHS	VPT.....SPIELVPPEAQVWGSNAV
NarM_CKS	183	GGIEECPARYPNMHDDFSTN	PHSVNYHKGVIQSAAELSGGYAAHNLLSLP
EbdC_EbN1	191	WEVVISRPLRVKAEEG
EbdC2_EbN1	161	W.QVIFRRSLANRDGL
SerC_Thau	160	W.NVILCRSMATGDGL
DdhC_Rhodo	189	WTVVYSRQLDAPSEN
ChlC_Ideo	191	WEVVISRPLRVKAEEG
NarM_Ha	206	WIVVMSRPLASEGDHQ
NarM_Hf	190	WTIVMSRELNSDAENR
NarM_Ap	201	WYVVIIRPLGSVHPLM
NarM_Pa	203	YKDGK.....	WMVVLRYRPTGSIHEL
NarM_CKS	233	RGRAVEDLNAEGFGTLTSQDHQD	VDGCSKFENKKTWTVVFCRSLNTGDPLD
EbdC_EbN1	207	ADLQGRRTMPIAF	AAWDGENQERDGLKAVTMEWW...
EbdC2_EbN1	176	VQLPIGGNGKIAF	ALWNGNKRSGRK...SFGSD...
SerC_Thau	191	AKLQAGGSSKIAF	AVWSGGNAERSGRK...SYSGE...
DdhC_Rhodo	205	TDLRTDGLDVAF	AVWNGSNGERSGQKAVSE.WH...
ChlC_Ideo	207	ANLQGRRTMPIGF	AAWDGENQERDGLKAVTMEWW...
NarM_Ha	222	VSFERDTI.PVAF	ALWQGADAQRDGLKLVLNWI...
NarM_Hf	206	SSFAANDVDVAF	AVWNGSQMERSGRKSVSE.WY...
NarM_Ap	217	ASLAEGF..SAAF	ATWDGAKGEIGGLKATSG.WV...
NarM_Pa	224	PTLEPGSETSVAF	AVWQGSKAIEVGKKSTSA.WF...
NarM_CKS	284	VQFVPGESTYFNM	AVWNGDREDRNGQKNISIQWH...

Abbildung 70: Sequenzvergleich der koordinierenden Liganden des Häm b-Kofaktors einiger Molybdänenzyme der Subfamilie Typ II der DMSO-Reduktase Familie. Für die Proteine wurden folgende Abkürzungen verwendet: ClrC, Chloratreduktase; NarM, periplasmatische Nitratreduktase, EbdC, Ethylbenzol Dehydrogenase, EbdC2, Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnliches Enzym; SerC, Selenatreduktase; DdhC, Dimethylsulfid Dehydrogenase, Abkürzungen für die Organismen sind: Ap, *Aeropyrum pernix* K1; Rhodo, *Rhodovulum sulfidophilum*, Thau, *Thauera selenatis*; Pa, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2, Ideo, *Ideonella dechloratans*, Ha, *Haloarcula marismortui*; Hf, *Haloferax mediterranei*; EbN1, *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1; CKS, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*. Die konservierten Liganden M (Methionin) bzw. K (Lysin) des Häm b-Kofaktors sind gelb unterlegt.

Ebenso findet man Übereinstimmungen mit den Sequenzen entsprechender Gamma-Untereinheiten anderer Mitglieder der Subfamilie Typ II, wie zum Beispiel der Selenatreduktase (Krafft *et al.*, 2000), der Chloratreduktase (Thorell *et al.*, 2003), der Dimethylsulfid Dehydrogenase (McDevitt *et al.*, 2002) und auch derjenigen einer zweiten möglichen Ethylbenzol Dehydrogenase, welche als Paralog im Chromosom von Stamm EbN1 codiert ist (Rabus *et al.*, 2005). Die Häm *b*-Liganden Methionin und Lysin sind bei all diesen Enzymen konserviert (Abbildung 70).

1.4. Das aktive Zentrum und die Katalyse

Das aktive Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase ist durch das Molybdän-Atom definiert, welches durch eine 25 Å lange tunnelförmige Tasche erreicht werden kann. Diese Tasche ist mit meist nichtpolaren Resten ausgekleidet. Das Molybdän-Atom ist in einer leicht deformierten trigonal prismatischen Geometrie durch sechs Liganden koordiniert (Abbildung 71). Vier der Liganden sind *cis*-Dithiol-Schwefelatome der zwei MGD Moleküle, die zwischen 2.3 Å und 2.5 Å entfernt liegen (Abbildung 71). Die fünfte und sechste Koordinierungsstelle ist durch ein Asp223-Oδ2 und ein Sauerstoffatom eines gebundenen Puffer-Acetat-Ions besetzt, die jeweils 2.0 Å und 2.4 Å entfernt liegen. Die Seitenkette des Asp223 wird durch ein Lys450-Nζ gebunden, das durch die Carboxyl-Sauerstoffe der Reste 222 und 446 unterstützt wird. Diese Interaktionen verstärken Asp223 als monodentaten Liganden des Molybdäns. Eine monodentate Aspartat-Ligandierung am Molybdän wurde auch in einer der zwei publizierten NarG-Strukturen gefunden, wohingegen in der anderen Struktur eine bidentate Aspartat-Koordination gefunden wurde (Tabelle 28; Bertero *et al.*, 2003; Yormakka *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Mo-*bis*MGD Enzymen, ist das Substrat der Ethylbenzol Dehydrogenase ein Kohlenwasserstoff, dem Heteroatome (wie zum Beispiel Sauerstoff oder Stickstoff) fehlen, welche direkt an das katalytische Metallatom binden könnten. Das Enzym muss speziell einen unpolaren Kohlenwasserstoff binden und stereospezifisch das C1-Atom hydroxylieren. Im analysierten Ethylbenzol Dehydrogenase Kristall hat das Molybdän-Ion keine ligandierte Oxo-Gruppe (Abbildung 71), was auf den reduzierten Mo(IV)-Zustand des Enzyms hindeutet. Die sechste Koordinationstelle ist durch ein Acetat-Puffer-Ion besetzt. Dieser Zustand entspricht jenem nach Ablauf eines Halb-Zyklus der enzymatischen Reaktion, wenn das Substrat oxidiert wurde und die Elektronen auf das Enzym abgegeben hat. Im normalen Reaktionsablauf befände sich das Molybdän im reduzierten Mo(IV)-Zustand und das Reaktionsprodukt (*S*)-1-Phenyl-ethanol wäre immer noch in dem aktiven Zentrum gebunden, bevor es dissoziiert und das Metall-Zentrum re-oxidiert wird. Um die geometrischen Voraussetzungen der katalytischen Reaktion herauszustellen, wurde ein Produktmolekül in das aktive Zentrum modelliert (Abbildung 71). Hierfür wurde die Position des Acetat-Sauerstoffatoms genutzt, welches am Molybdän gebunden ist. Das modellierte Produkt passt sehr gut in die Tasche des aktiven Zentrums. Die

Tryptophan-Reste Trp87 und Trp481 auf der einen Seite und Asp223 auf der anderen Seite bilden eine Einschnürung, welche verhindert, dass weitere Phenylringe zum aktiven Zentrum vordringen können. Zur selben Zeit bilden diese eine kleine Tasche, welche von der Haupttasche in einen Winkel von ca. 110° abzweigt, der wiederum durch Phe446 geschlossen wird. Diese kleine Tasche ist ideal, um Methylgruppen zu binden, wie sie in Ethylbenzol und verwandten Substraten zu finden sind. In Übereinstimmung mit bisherigen biochemischen Daten (Kniemeyer *et al.*, 2003; Szaleniec *et al.* 2006), ist die Substrat-Bindetasche darüber hinaus weit genug, um Platz für mono- und bizyklische Substrate zu haben und erlaubt auch die Modellierung eines Naphthylethanols als alternativen Umsetzungsprodukts. Ausgehend von der Bindungsgeometrie des modellierten Produkts ist es wahrscheinlich, dass das Substrat Ethylbenzol eine ähnliche Position im aktiven Zentrum einnimmt. Aufgrund des schmalen Abgangs der Tasche kann das Substratmolekül nicht von jeder Seite eintreten, sondern muss sich dem Metallzentrum zuerst mit der Ethylgruppe nähern.

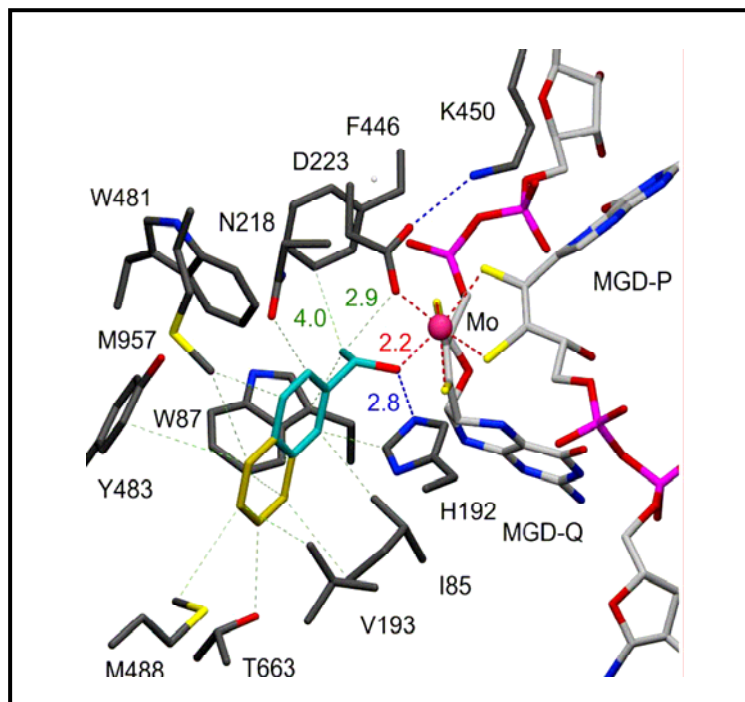


Abbildung 71: Das aktive Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase. Die Position des Reaktionsprodukts *S*-(1)-Phenylethanol (petrol) und, nach Addition des zweiten Phenylrings (gelb), auch die Position des Produkts (*S*)-1-(2-Naphthyl)ethanol sind gezeigt. Alle grün gestrichelten Linien bezeichnen Entfernungen, die größer sind als 3.2 Å. Vier Entfernungen sind genauer angegeben. Die Addition des zweiten Phenylrings verursacht nur eine geringfügige Änderung der Konformation und Position des Produkts. Das veranschaulicht wie Substrate aufgenommen werden können, die größer sind als das herkömmliche Ethylbenzol. Das Modell überlagert das gebundene Puffer-Acetat-Molekül. Das Molybdän zeigt eine leicht deformierte trigonal prismatischen Geometrie. Der offene Molybdopterin Kofaktor MGD-P und der geschlossene Kofaktor MGD-Q dienen durch ihre Dithiol-Schwefel als bidentate Liganden. Der fünfte Ligand Asp223-Oδ2 wird unterstützt durch Lys450-Nζ. Mit der OH-Gruppe des Alkohols bildet His192 eine H-Brücke, so dass während der Katalyse eine Rolle dieser Aminosäure als Base erwartet werden kann.

1.5. Elektronentransport

Nach der Hydroxylierung von Ethylbenzol ist das Molybdän im Mo(IV) Stadium und muss zum Mo(VI) reoxidiert werden, um den Reaktionszyklus abzuschließen. Dies wird durch die Aneinanderreihung von Redox-Kofaktoren erreicht, die das Molybdän mit dem Häm *b* der Gamma-Unter-einheit verbinden und die Elektronen zu einem bis jetzt unbekannten Elektronenakzeptor leiten. Vermutlich ist dieser terminale Elektronenakzeptor ein Cytochrom *c*, welches die Ethylbenzol Oxidation an die Nitratatmung von *Aromatoleum aromaticum* koppelt. Die Struktur der Elektronentransportkette ist in Abbildung 72 zu sehen.

Die Elektronentransportkette startet mit einer verhältnismäßig langen Entfernung von 8,4 Å zwischen dem S4 α Atom des MGD-Q am Mo(IV) und Cys86-S γ am Zentrum FS0. Hier wäre ein durch Bindungen laufender Ladungs-Transfer kombiniert mit einem 4,0 Å langen räumlichen Transfer vom C4 α oder N10 Atom des MGD-Q zum Cys86-C α denkbar (Abbildung 72). Das Zentrum FS0 ist ungewöhnlich, da einer der vier Eisen Liganden ein Histidin anstelle eines üblicherweise beobachteten Cysteins ist. Ein ähnliches Umfeld eines [4Fe-4S]-Zentrum wurde zuvor nur in der Nitrate Reduktase NarG (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004), in einer Hydrogenase (Volbeda *et al.*, 1995) und im Rieske-Protein des Cytochrom bc1 Komplexes (Iwata *et al.*, 1996) gefunden. Darüber hinaus ist Lys129-N ζ durch eine Wasserstoffbrücke an N8 α des MGD-Q gebunden und liegt nahe zum Cys127--S γ des FS0 (3,9 Å Entfernung). Lysin oder Arginin wurde auch an denselben Stellen der NarG (Bertero *et al.*, 2003), der Formiat Dehydrogenasen-N und -H (Jormakka *et al.*, 2002, Boyington *et al.*, 1997), der assimilatorischen Nitratreduktase NapA (Dias *et al.*, 1999; Arnoux *et al.*, 2003) und der Arsenit Oxidase (Ellis *et al.*, 2001) beobachtet. Dieser Rest ist wahrscheinlich wichtig, weil in NapA von *Ralstonia eutropha* ein Austausch von Lysin zu Methionin das Enzym komplett inaktiviert (Hettmann *et al.*, 2003). Der Histidin-Ligand und das angrenzende Lysin deuten auf ein relativ hohes Mittelpunkt-Redoxpotential des FS0 hin.

In jedem der folgenden Transferschritte von FS0 bis FS4 liegen zwei der vier Cysteine, die an die jeweiligen Zentrums angrenzen, sehr eng beieinander. Das erinnert an die Beziehung zwischen den zwei Zentren des Ferredoxins (Abbildung 67). Alle Entfernungen sind sehr kurz, so dass der Transfer schneller verlaufen sollte als die chemischen Reaktionen (Page *et al.*, 1999).

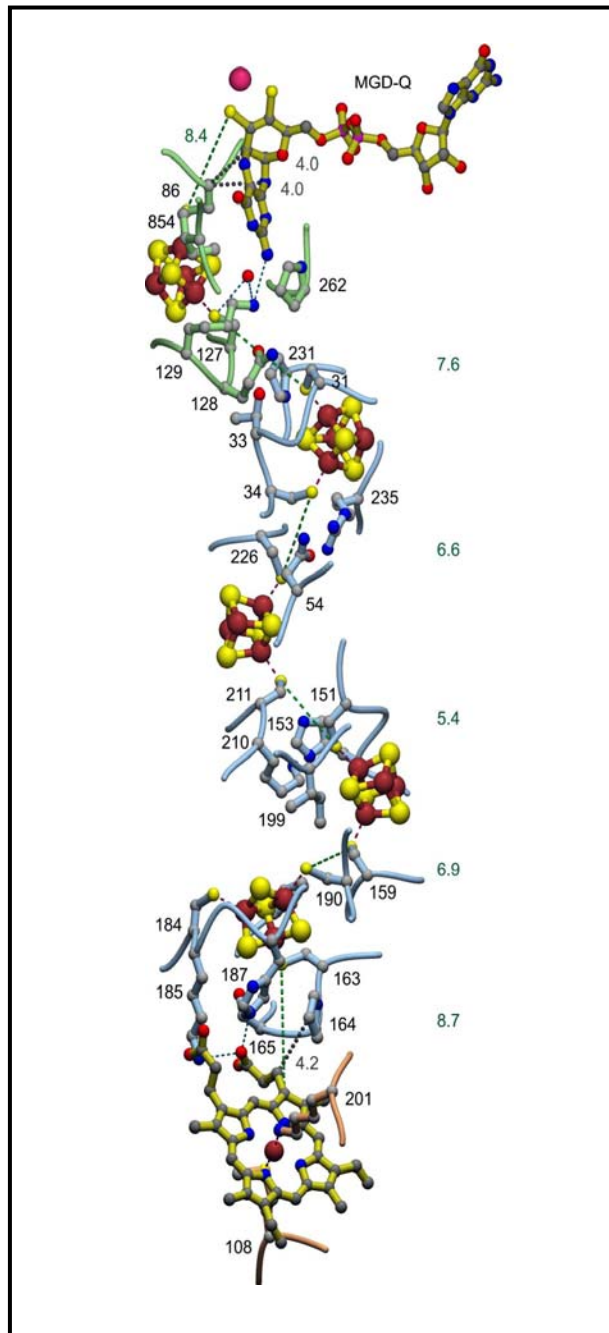


Abbildung 72: Die Elektronentransportkette zwischen dem Molybdän und Häm *b*. Alle Reste sind in den Farben ihrer Untereinheit gezeigt (Abbildung 9). Die axialen Liganden des Häm-Eisens sind Methionin und Lysin. Lys185 und His187 der Beta-Untereinheit liegen in nächster Nähe zum [3Fe-4S]-Zentrum FS4 und sind durch Wasserstoffbindungen direkt an die Propionatseitenketten gebunden. Die Entfernungen der Redoxfaktoren, die sich zwischen der Thiolgruppe am Molybdän, den Cystein Sy Atomen, welche die Zentren halten, und den Prophyirinringen befinden, sind durch grün-gestrichelte Linien gekennzeichnet. Wasserstoffbindungen sind als schwarz-gestrichelte Linien gezeigt und die räumlich ermöglichten Transfertrouen von 4,0 Å und 4,2 Å sind durch grau-gepunktete Linien dargestellt.

Der letzte Schritt vom [3Fe-4S] Zentrum FS4 zum Häm läuft über die längste Entfernung. Es gibt jedoch einen möglichen Transfer-Pfad zum 1-Kohlenstoff eines Propionats des Häm b entlang von Wasserstoffbrückenbindungen. Diese verlaufen zwischen Lys185 und His187 der Beta-Untereinheit und den zwei Propionatgruppen des Häms, wie auch über Cys163 und Pro164-C δ (Abbildung 72). Die Addition der sechs einzelnen Transfer-Distanzen ergibt 43.6 Å, welche 20.4 Å kürzer ist als die direkte Entfernung von 64.0 Å zwischen dem Molybdän und dem Häm-Eisen.

1.6. Vergleich der Ethylbenzol Dehydrogenase mit Nitratreduktase

Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist nach der respiratorischen Nitratreduktase NarGHI von *Escherichia coli* erst das zweite Mitglied der Typ II Unterfamilie der Enzyme der DMSO Reduktase-Familie, dessen Struktur aufgeklärt wurde. Beim Vergleich der Ethylbenzol Dehydrogenase mit NarGHI (Blasco *et al.* 2001; Richardson *et al.*, 2001; Bertero *et al.*, 2003) fällt zuerst die verschiedene zelluläre Lokalisation auf. Die Ethylbenzol Dehydrogenase ist ein lösliches periplasmatisches Enzym (Kniemeyer *et al.*, 2001a), während die Nitratreduktase durch ihre Gamma-Untereinheit in der Cytoplasmamembran verankert ist und mit ihren katalytischen Untereinheiten zur cytoplasmatischen Seite der Membran hin orientiert ist (Blasco *et al.* 2001; Richardson *et al.*, 2001; Bertero *et al.*, 2003). Die Gamma-Untereinheit der Nitratreduktase besteht zum Großteil aus Alpha-Helices und ist als typisches Membranprotein komplett in die Membran integriert, während die Gamma-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase aus Beta-Faltblattstrukturen besteht und nicht membranassoziiert ist (Diskussion 1.2.). Weiterhin sollte angemerkt werden, dass der Elektronenfluss bei der Ethylbenzol Dehydrogenase gegenüber der respiratorischen Nitratreduktase (Bertero *et al.*, 2003) umgekehrt ist, obwohl die Transferpfade strukturell sehr ähnlich sind (Diskussion 1.5.). In der Ethylbenzol Dehydrogenase wird das Substrat in der Alpha-Untereinheit anaerob oxidiert und die daraus abgespaltenen Elektronen werden auf das Häm b der Gamma-Untereinheit übertragen, von wo sie vermutlich auf ein lösliches Cytochrom abgegeben werden (Kniemeyer *et al.*, 2001a; Szaleniec *et al.* 2003). Dagegen nehmen die zwei Häm-Ko-faktoren der Gamma-Untereinheit der Nitratreduktase, die in der Membran lokalisiert sind, Elektronen aus dem Quinol-Pool auf, die dann zur Alpha-Untereinheit transportiert werden und zur Reduktion des Nitrats zu Nitrit verwendet werden (Richardson *et al.*, 2001; Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004). Das deutet darauf hin, dass die Beta-Untereinheiten als reine Leitungsmodule funktionieren sollten, bei dem ähnliche Redoxpotentiale für alle vier Zentren erwartet werden könnten.

Die Ethylbenzol Dehydrogenase besitzt in ihrer Alpha-Untereinheit ein Twin-Arginin Motiv (Rabus *et al.*, 2002). Die Gegenwart dieses Motivs ist charakteristisch für Kofaktor-haltige Proteine, die im Cytoplasma gefaltet werden und dann durch den TAT (Twin-Arginin-Translokation)-Transportweg ins Periplasma geschleust werden (Berks *et al.* 2000; Sargent *et al.*, 2002). Auch andere Typ II-Enzyme der DMSO-Reduktase-Familie haben ein Twin-Arginin-

Signal und werden über den TAT-Transportweg ins Periplasma geschleust (Krafft *et al.* 2000; Yoshimatsu *et al.* 2002, Abbildung 73). Im Gegensatz dazu besitzt NarG der respiratorischen, membrangebundenen Nitratreduktase jedoch keinerlei Twin-Arginin-Signalsequenz. Die Nitratreduktasen extrem halo- und thermophiler Archaea (Yoshimatsu *et al.*, 1999, Lledó *et al.*, 2004) unterscheiden sich von NarGHI durch die Anwesenheit eines Twin-Arginin Motivs und sollten folglich außerhalb des Cytoplasmas lokalisiert sein. Zugleich findet man bei diesen archaealen Nitratreduktasen Gamma-Untereinheiten vom EbdC-Typ, die die Enzyme offenbar durch eine C-terminale Membranhelix-ähnliche Verlängerung an der Außenseite der Membran verankern (Yoshimatsu *et al.*, 1999, Lledó *et al.*, 2004).

EbdA_EbN1MTRDEMISVEPEAAELQDQHRRDFLKRSG
EbdA2_EbN1MDDLKNTDAIRTGVSSAFDQNRGFLKRSG
Ebda_EB1MTRDEMISVEPEAAELQDQHRRDFLKRSG
SerA_ThauMRKVMNSPDDGNGRRRFLQFSM
DdhA_RhodoMLRRTTRRRRLMQLGAS
ClrA_IdeoMNSPDEHNGRRRFLQFSA
PcrA_DeclMARLSRRRDFLKASA
Nar_HaMSRNDLTDDGDSAGISRRDFVRGLG
Nar_PyroMLKTTRRRMLAGVA
Nar_Hf	MSRNDASQLDDGETTAESPDDQANDAPEVGDPPGDPVDADSGVSRRTFLEGIG
Nar_ApLSQQKGEGNGGGPVLKLSRRGFLKVLA
NarG_Ec
EbdA_EbN1	AAVLSLSLSSLAT...GVVPGFLKDAQAGTKAPGYASWEDIYRKEWKWDKVN
EbdA2_EbN1	AGALSLSLSSFAA...GLVPGFVNAAQAGKRGPTYATWEDVYRNEWKWDKVT
Ebda_EB1	AAVLSLSLSSLAT...GVVPGFLKDAQAGTKAPGYASWEDIYRKEWKWDKVN
SerA_Thau	AALASAAAPSSVW...AFSKIQPIEDPL...KSYPYRDWEDLYRKEWTWDSTG
DmsA_Rhodo	LVGAGLFAAGRGW...ALNRLPIGDTLAEFYRYPYRDWEDLYRNEFTWDYVG
ClrA_Ideo	AALASAAAPSLW...AFSKIQPIEDPL...KDYRYPYRDWEDLYRKEWTWDSVG
PcrA_Decl	ATLLGNLSTFKTL...AA...TMDLSGAFEFYSGWENFHRNQWSWDKKT
Nar_Ha	AASLLGATGLSFA.DDG...MDGLEAVDDPIGSYPYRDWEDLYRDEWDWDSVA
Nar_Pyro	TISAAAWVMALAQNL...QYLQPLAQFVNTRLQYPDRSWEELYRRRWQYDKVA
Nar_Hf	VASLLGI.GTSAASDDSLFQMGGLKPVDDPIGNYPYRDWEDLYRKEWDWDSVS
Nar_Ap	AAGLLSSLGPLAS.ALSSNRYLTITIETPRLGYPEDLRGWEEKFYRDMWAYDKVA
NarG_EcMSKFLDRFRYFKQKGETFADGHGQLLNTNRDWEDGYRQRWQHDKIV

Abbildung 73: Sequenzvergleich von TAT-Transport-Signalsequenzen einiger TypII-Enzyme. Für die Proteine wurden folgende Abkürzungen verwendet: NarG, membrangebundene, respiratorische Nitratreduktase; Nar, periplasmatische Nitratreduktase; EbdA, Ethylbenzol Dehydrogenase, EbdA2, Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnliches Enzym; PcrA Perchloratreduktase; ClrA, Chloratreduktase; SerA, Selenatreduktase; DdhA, Dimethylsulfid Dehydrogenase, Abkürzungen für die Organismen sind: Rhodo, *Rhodovulum sulfidophilum*, Ec, *Escherichia coli*; Thau, *Thauera selenatis*; Pyro, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2, Ideo, *Ideonella dechloratans*, Ha, *Haloarcula marismortui*; Hf, *Haloferax mediterranei*; Ap, *Aeropyrum pernix* K1; Decl, *Dechloromonas aromatica*, EbN1; *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1, EB1, *Aromatoleum aromaticum* Stamm EB1. Die konservierte Twin-Arginin-Signal-Sequenz wurde gelb unterlegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ethylbenzol Dehydrogenase ein großes und komplexes Enzym mit modularer Architektur ist. Jede Untereinheit hat eine Teilfunktion und seine eigene Gruppe an evolutionär verwandten Proteinen.

2. Die Funktion der Ethylbenzol Dehydrogenase

2.1. Die Katalyse der Ethylbenzol Dehydrogenase

Ethylbenzol ist ein relativ unreaktiver aromatischer Kohlenwasserstoff (Johnson *et al.*, 2001). Chemische Substitution dieses Kohlenwasserstoffes läuft normalerweise am Benzol-Kohlenstoff ab, da das Reaktionsintermediat dort durch eine Delokalisation durch den aromatischen Ring stabilisiert werden kann (Johnson *et al.*, 2001). Ethylbenzol Dehydrogenase katalysiert dagegen die enzymatische Oxidation der Seitenkette des aromatischen Kohlenwasserstoffes Ethylbenzol und den stereoselektiven Transfer einer von Wasser abstammenden Hydroxylgruppe. Substrat-Umsetzungsstudien mit der Ethylbenzol Dehydrogenase ermöglichen einen genaueren Blick auf diese einzigartige Reaktion. Das Molybdänenzym reagiert mit einem relativ großen Spektrum von ca. 20 identifizierten Substraten (Johnson *et al.*, 2001; Kniemeyer *et al.*, 2001a; Szaleniec *et al.*, 2006; Ergebnisse 2.1.). Diese können dabei in mehrere Gruppen eingeteilt werden: (i) aromatische Kohlenwasserstoffe mit Ethyl- oder Propyl-Seitengruppe (Ethylbenzol, 2-,3- und 4-Ethyltoluol, 1,4-Diethylbenzol, n- Propylbenzol, 2-Ethylnaphtalin, 4-Ethylbiphenyl); (ii) nicht-Kohlenstoff-substituierte Kohlenwasserstoffe (2-,3-,4-Ethylphenol, 2- und 4-Ethylanilin, 4-Fluorethylbenzol, 4-Ethylanisol) und (iii) heteroaromatische Verbindungen (3-Ethylpyridin, 2-Ethylpyrrol, 2-Ethylfuran, 2-Ethylthiophen) (Abbildung 74). Ein Vergleich von alternativen Substraten, welche Substituenten in ortho-, meta- oder para-Stellung tragen, wie zum Beispiel Ethylphenol und Ethyltoluol, ergibt, dass diejenigen Substrate besser umgesetzt werden, welche ihren Substituenten in para-Stellung tragen. Diese para-substituierten Substrate reagieren ca. 10-fach schneller als ihre ortho-Derivate. Auch bei 2- und 4-Ethylanilin ergibt sich eine ähnliche Situation. Also ist die Position des Substituenten am aromatischen Ring entscheidend für die Reaktivität dieser Verbindungen. Im Gegensatz dazu wird unter den heterozyklischen Ethylpyridinen nur das Meta-Derivat umgesetzt, während 2- und 4-Ethylpyridin als Inhibitoren der Ethylbenzol Dehydrogenase wirken (Szaleniec *et al.*, 2006). Heterozyklen, welche einen mit fünfgliedrigen Ringen sind alle reaktiver als Ethylbenzol (Abbildung 74). Darüber hinaus werden vom Enzym weder Methyl-Benzol-Derivate (Toluol, 2-Fluortoluol, Hexamethylbenzol) (Szaleniec *et al.*, 2006; Ergebnisse 2.1.) noch methylierte heteroaromatische Verbindungen (Methylfuran, Methylthiophenol) (Szaleniec *et al.*, 2006) umgesetzt. Eine chemische Umsetzung erfolgt im aktiven Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase also nur, wenn eine Ethyl- oder Propylgruppe im Substrat vorhanden ist. Methylbenzol-Derivate können aber durchaus an die Ethylbenzol Dehydrogenase binden, denn einige unter ihnen wirken als Inhibitoren (Toluol, 2-Fluortoluol, 4-Ethylbenzoat), wobei Toluol als moderater, kompetitiver Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase identifiziert wurde und damit auch an das aktive Zentrum des Enzyms binden sollte (Ergebnisse 2.2.1. und 2.3.1.; Tabelle 35). Benzol-Derivate mit C4-Kohlenstoffseitenketten werden nicht mehr umgesetzt, wobei eine Verzweigung der Kohlenstoffkette, wie im Falle von

iso-Propylbenzol, sogar die Bindung des Moleküls an das Enzym verhindert. Dagegen wirkt Butylbenzol als moderater Inhibitor.

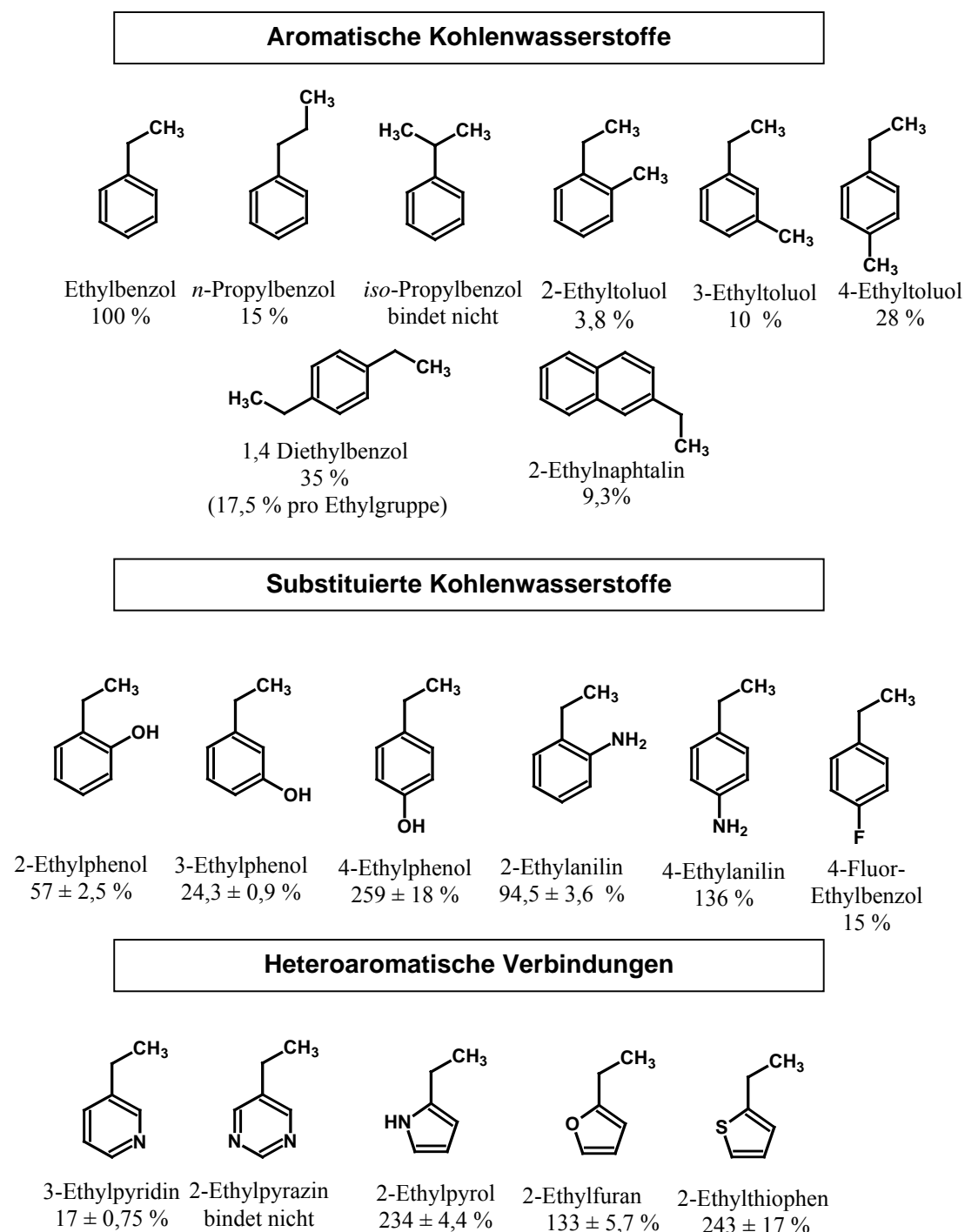


Abbildung 74: Substratspektrum der Ethylbenzol Dehydrogenase (Szaleniec *et al.*, 2006). Die relativen Aktivitäten sind unterhalb der Strukturformel gezeigt und beziehen sich auf die Umsetzung von ca. 60 µM Ethylbenzol, welche als 100 % gesetzt wurde. Die Aktivitäten wurden bei 30 °C gemessen. Einige Daten dieses Substratspektrums wurden noch nicht veröffentlicht und wurden deshalb freundlicherweise von M. Szaleniec zur Verfügung gestellt.

Nicht nur die Position des Substituenten am aromatischen Ring ist ausschlaggebend für dessen Umsatzrate, sondern auch der Substituent selbst. Handelt es sich dabei um eine Hydroxy- oder eine Aminogruppe, wie zum Beispiel bei den Derivaten von Ethylphenol bzw. Ethylanilin, ist das entsprechende Derivat im Vergleich zu Alkyl-substituierten Derivaten (Ethyltoluol-Derivate und 1,4 Diethylbenzol) insgesamt reaktiver. Die induktiven Effekte von Substituenten, welche elektronenziehende oder –schiebende Eigenschaften besitzen, haben also offenbar starken Einfluss auf die Reaktivität. Sie wirken sich vermutlich über die Stabilisierung von Übergangszuständen der Reaktion aus. Die beobachteten Effekte sind konsistent mit der Annahme, dass die Ethylbenzol Oxidation vermutlich über ein Carbokation als Reaktionsintermediat abläuft (Johnson *et al.*, 2001). Dieses kann durch Delokalisation der Ladung in den aromatischen Ring gut stabilisiert werden. Diese Beobachtungen stimmen mit einer gängigen Erfahrung in der organischen Chemie über elektrophile Substitution von aromatischen und heterozyklischen Verbindungen überein, bei welchen die Stabilität eines Carbokation-Übergangszustandes über Reaktivität der Verbindung entscheidet (Szaleniec *et al.*, 2006). Dieser Übergangszustand der Ethylbenzol Oxidation wurde bereits in früheren Studien vermutet, wobei angenommen wurde, dass eine benachbarte Aryl- oder eine heterozyklische Gruppe diesen Übergangszustand stabilisieren (Johnson *et al.*, 2001). So würden Substituenten, welche eine positive Ladung in ortho- und para-Position zur Ethylgruppe stabilisieren, die Reaktionsrate steigern und die Aktivierungsenergie herabsetzen (Szaleniec *et al.*, 2006). Diese Annahme wird durch Temperaturabhängigkeitsmessungen weiter unterstützt (Ergebnisse 2.4., Tabelle 35).

Tabelle 35: Vergleich der Umsatzraten einzelner Substrate der Ethylbenzol Dehydrogenase mit den entsprechenden Aktivierungsenergien (Ergebnisse 2.4.; Szaleniec, *et al.*, 2006). Die Umsatzraten beziehen sich auf die Umsetzung von Ethylbenzol bei 30 °C, welche als 100 % gesetzt wurde. Die spezifische Aktivität der Ethylbenzol Dehydrogenase betrug $0,5 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

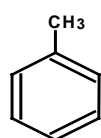
Substrat	Umsatzrate	Aktivierungsenergie
Ethylbenzol	100 %	$30,4 \pm 3,9 \text{ kJ/mol}$
4-Ethylphenol	259 %	$19,5 \pm 2,5 \text{ kJ/mol}$
4-Ethylanisol	25 %	$52,4 \pm 6,6 \text{ kJ/mol}$
2-Ethyltoluol	3,8 %	$45,6 \pm 4,8 \text{ kJ/mol}$

Eine Stabilisierung eines Carbokation-Intermediats ist auch bei fünfgliedrigen Heteroaromaten (Ethylfuran, Ethylthiophen, Ethylpyrrol) zu erwarten, deren Ethylgruppe sich in einer Orthoposition befindet (Abbildung 74). Zudem unterscheiden sich diese in Bezug auf die Elektronenkonfiguration erheblich von sechsgliedrigen Heteroatomen (Latscha, 2002). Sie können im Gegensatz zu Sechsring-Heterozyklen vier weitere Grenzstrukturen mit einer positiven Ladung am Heteroatom und einer delokalisierten, negativen Ladung an den C-Atomen ausbilden. Sie sind also polarisiert und verfügen über eine relativ hohe negative Ladungsdichte im π -System. Daher werden sie leicht in elektrophilen Substitutionen umgesetzt. Bei schwach elektronenschiebenden

Substituenten, wie zum Beispiel einer para-Methylgruppe in 4-Ethyltoluol, sinkt die Reaktionsrate. Im Gegensatz dazu sollte die Aktivität im Falle von Verbindungen abnehmen, welche elektronenziehende Substituenten in para- oder ortho-Position haben, wie zum Beispiel bei 4-Fluorethylbenzol (Abbildung 74) oder auch 1-Bromo-2-Ethylbenzol, 2- oder 4-Ethylpyridin, welche nicht umgesetzt werden als Inhibitor wirken (Szaleniec *et al.*, 2006; Ergebnisse 2.2.1.). Eine gute Bindung von 4-Ethylpyridin an das aktive Zentrum des Enzyms wird durch dessen niedrigen K_{ic} -Wert bestätigt (Tabelle 36).

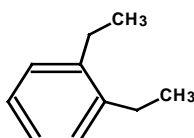
Tabelle 36: Inhibitoren der Ethylbenzol-Dehydrogenase. Inhibitionskonstanten und Hemmtypen der einzelnen Inhibitoren sind gezeigt, wobei K_i die Inhibitionskonstante für kompetitive Hemmung ist und K_{ic} und K_{iu} die Inhibitionskonstanten für die gemischte Hemmung sind. K_{ic} ist die Hemmkonstante für den kompetitiven Anteil der gemischten Hemmung und K_{iu} für den nicht-kompetitiven Anteil.

Kompetitive Inhibitoren



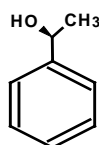
Toluol

$$K_i \ 3,4 \pm 1,1 \ \mu\text{M}$$



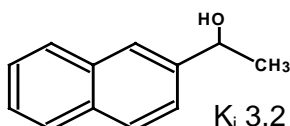
1,2 Diethylbenzol

$$K_i \ 0,4 \pm 0,1 \ \mu\text{M}$$



(S)-1-Phenylethanol

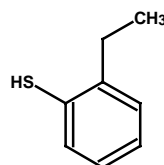
$$K_i \ 12,7 \pm 7,3 \ \mu\text{M}$$



1-(2Naphtyl)ethanol

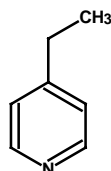
$$K_i \ 3,2 \pm 0,4 \ \mu\text{M}$$

Gemischte Inhibitoren



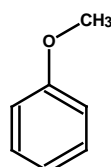
2-Ethylthiophenol

$$\begin{aligned} K_{ic} & \ 0,04 \pm 0,01 \ \mu\text{M} \\ K_{iu} & \ 18,6 \pm 6,6 \ \mu\text{M} \end{aligned}$$



4-Ethylpyridin

$$\begin{aligned} K_{ic} & \ 13,6 \pm 3,3 \ \mu\text{M} \\ K_{iu} & \ 4095 \pm 931 \ \mu\text{M} \end{aligned}$$



Anisol

$$\begin{aligned} K_{ic} & \ 0,9 \pm 0,1 \ \mu\text{M} \\ K_{iu} & \ 240 \pm 33 \ \mu\text{M} \end{aligned}$$

Auch sterische Effekte spielen eine Rolle bei der Reaktivität von Substraten, so wird zum Beispiel 1,4 Diethylbenzol umgesetzt (Abbildung 74), wohingegen 1,2 Diethylbenzol ein kompetitiver Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase ist (Ergebnisse 2.3.4.), welcher sogar den stärksten inhibitorischen Effekt unter den kompetitiven Inhibitoren bewirkt (Tabelle 36). Vermutlich verhindert die zweite Ethylgruppe von 1,2 Diethylbenzol, die sich in ortho-Stellung befindet, durch eine sterische Hinderung die Addition von Wasser an das Molybdän, wobei die Rückoxidation zu Molybdän(VI) verhindert wird und der Inhibitor im aktiven Zentrum verbleibt. Aufgrund sterischer Hindernisse werden vermutlich auch 4-Ethylbenzoat und n-Butylbenzol nicht umgesetzt und sind stattdessen schwache Inhibitoren des Enzyms (Ergebnisse 2.2.1.).

Das Produkt einer Umsetzung wirkt meist wiederum als Inhibitor einer Reaktion. Eine Produktinhibition kann im Falle (*S*)-1-Phenylethanol, dem Produkt der Ethylbenzol-Oxidation, beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um einen sehr schwachen kompetitiven Inhibitor (Ergebnisse 2.2.3.; Tabelle 36). Ein stärkerer kompetitiver Produktinhibitor ist jedoch 1-(2-Naphtyl)ethanol (Ergebnisse 2.3.2., Tabelle 36), das Produkt der Umsetzung von 2-Ethylnaphtalin, obwohl dieses im Vergleich zu Ethylbenzol schlechter umgesetzt wird (Abbildung 74). Vermutlich füllt das größere Produktmolekül die Substratbindetasche besser aus und wirkt so als effektiverer Inhibitor (Diskussion 1.4.; Abbildung 71). Als weitere verwandte Inhibitoren wurden das Enantiomer (*R*)-1-Phenylethanol und die 1-Phenylethylamine gefunden. Die letzteren haben dabei eine stärkere inhibitorische Wirkung als die 1-Phenylethanole (Ergebnisse 2.2.1.). 2-Ethylthiophenol ist der bisher effektivste bekannte Inhibitor des Enzyms. Eine inhibitorische Wirkung wurde diesem Molekül bereits durch Analyse durch Artificial-Neural-Networks (ANN) zugeordnet, ein Modell welches Reaktionsähnlichkeiten in Gruppen von Substraten entdecken kann und das chemische Verhalten von neuen, nichtgetesteten Verbindungen vorhersagen kann (Szaleniec *et al.*, 2006). Durch seine Ethylgruppe kann es auf die gleiche Weise wie das Substrat Ethylbenzol an das aktive Zentrum binden. Gleichzeitig kann die substituierte Thiolgruppe vermutlich mit Cysteinen stabile Disulfidbrücken ausbilden, welche vermutlich die Stabilität und Konformation des Enzyms beeinträchtigen. Eine dauerhafte Schädigung des Enzyms durch 2-Ethylthiophenol wurde allerdings aufgrund der Reversibilität der Inhibition ausgeschlossen (Ergebnisse 2.2.1.). Vergleicht man die Reaktivität von 4-Ethylanisol und Anisol, welches ein sehr guter gemischter Inhibitor der Ethylbenzol Dehydrogenase ist (Tabelle 35, Ergebnisse 2.3.7.), zeigt sich, dass die C1-Gruppe am Ethylrest entscheidend ist für die Substrat-Umsetzung (Abbildung 75). Bei Anisol ist diese C1-Gruppe durch ein Sauerstoffatom ersetzt, welches die Umsetzung verhindert.

Der Effekt von Na-Cyanid (1 mM) auf die Ethylbenzol Dehydrogenase wurde bereits in früheren Studien getestet (Kniemeyer *et al.*, 2001a), konnte aber nicht beurteilt werden, weil der Zusatz von Cyanid in den Testpuffer des Enzymtest-Ansatzes eine sehr starke nicht-enzymatische Hintergrundaktivität auslöst. Vermutlich entzieht Cyanid Eisen aus Ferrizentrum, so dass die

Reduktion von Ferrizinium im Aktivitätstest der Ethylbenzol Dehydrogenase nicht verfolgt werden kann. Ferricyanid ist bereits mit Eisen gesättigt und wurde in dieser Arbeit deshalb als Inhibitor identifiziert (Ergebnisse 2.2.2.). Diese Beobachtung erklärt, warum Ferricyanid als ebenso starkes Oxidationsmittel wie Ferrizinium nicht als Elektronenakzeptor der Ethylbenzol Dehydrogenase dient (Prof. J. Heider, persönliche Mitteilung). Vermutlich ist der Cyanid-Anteil des Moleküls für die Hemmung verantwortlich. Um das jedoch sicher zu stellen, müssen weitere Versuche durchgeführt werden, die zum Beispiel das spektroskopische Verhalten (z.B. Elektronenspinresonanzspektroskopie, UV-Vis-Spektroskopie) des Enzyms unter Anwesenheit von Cyanid untersuchen.

Eine detaillierte Analyse der V_{\max} - und K_m -Werte der durchgeführten Inhibitionskinetiken ergab, dass diese im Vergleich zu den V_{\max} - und K_m -Werten, die sich aus Kontrollmessungen ohne Inhibitor ergeben, nur gering abweichen (um ca. $0,06 \mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$ bei V_{\max} , und ca. $0,25 \mu\text{M}$ bei K_m) (Tabelle 37). Dies spricht für die gute Qualität der erhaltenen Daten und bestätigt die Ergebnisse der Kurvenanpassungen.

Tabelle 37: Vergleich der K_m und V_{\max} –Werte der Inhibitionskinetiken. Gezeigt ist ein Vergleich der V_{\max} und K_M Werte, welche sich aus allen Daten der entsprechenden Inhibitionskinetik ergaben, mit den V_{\max} und K_M Werten, die sich nur aus Kontrollmessungen ohne Inhibitor ergaben.

	Kontrolle		Inhibitionskinetik		Standardabweichung	
	V_{\max} [$\mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$]	K_m [μM]	V_{\max} [$\mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$]	K_m [μM]	V_{\max} [$\mu\text{mol min}^{-1}(\text{mg Protein})^{-1}$]	K_m [μM]
Toluol	1,40	0,82	1,44	0,94	0,028	0,085
1,2 Diethylbenzol	1,60	1,38	1,44	0,93	0,113	0,319
(S)-1-Phenylethanol	1,37	0,55	1,43	0,66	0,042	0,077
1-(2-Naphtyl)ethanol	1,69	0,83	1,45	0,63	0,169	0,141
2-Ethylthiophenol	1,59	1,38	1,55	0,74	0,028	0,452
4-Ethylpyridin	1,59	1,37	1,66	1,03	0,049	0,240
Anisol	1,59	1,37	1,55	0,75	0,028	0,438

Aus dem Substrat- und Inhibitionsstudien lässt sich folgender Reaktionsmechanismus ableiten (Abbildung 75). Die Reaktion startet an einer zu fordernden Oxogruppe, die im oxidierten Enzym am Molybdän (VI) gebunden sein muss. Das C2 Atom des im aktiven Zentrum gebundenen Ethylbenzols könnte durch Asp223-O82 polarisiert werden, was den folgenden Transfer der zwei Elektronen der C-H-Bindung vom C1 Atom zum Mo (VI) erleichtern würde. Das His192-Nε könnte dabei das Proton vom C1 Atom akzeptieren und an die Oxogruppe weiter geben. Das Molybdän wird dabei in seinen reduzierten Mo(IV) überführt. Dabei entsteht ein transientes Carbokation, welches anschließend die Hydroxylgruppe von Mo (IV) binden könnte, wobei (S)-1-

Phenylethanol entsteht. Die zwei Elektronen des Mo (IV) werden dann einzeln über die Fe-S-Zentren auf das Häm *b* und von dort zum externen Akzeptor überführt. Das re-oxidierte Mo(VI) kann dann ein Wassermolekül binden und in eine Oxogruppe überführen. Die zwei dabei entstehenden Protonen können durch His192 gebunden und durch die Tasche des aktiven Zentrums ins Periplasma abgeführt werden. Dieser Reaktionsmechanismus wird durch Enzymaktivitäts- und Inhibitionsdaten von verschiedenen Substrat-ähnlichen Verbindungen unterstützt (Abbildung 74; Ergebnisse 2.1.; 2.2. und 2.3.).

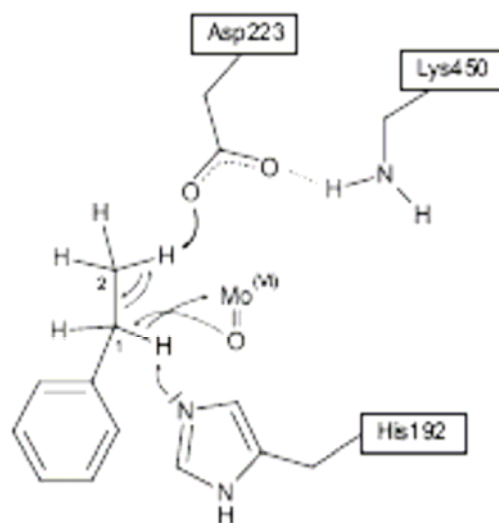


Abbildung 75: Reaktionsmechanismus der Ethylbenzol Dehydrogenase. Skizze der katalytischen Reaktion, die von einer an das Mo(VI) Ion gebundenen Oxogruppe startet. Die abschließende Bindung des Wassermoleküls an Mo(VI) ist nicht gezeigt.

Zusätzlich ergaben Temperaturabhängigkeitsmessungen, dass es sich bei der Ethylbenzol Dehydrogenase um ein thermophiles Enzym handelt, welches ihr Temperaturoptimum mit allen gemessenen Substraten zwischen 50 °C und 60 °C hat (Ergebnisse 2.4.) Das steht im Kontrast zum Organismus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1, welcher bei einer Optimumtemperatur von 30 °C wächst. Vermutlich wurde das Enzym durch horizontalen Gentransfer in der Evolution aus einem anderen thermophilen Organismus übertragen.

2.2. Die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die Ethylbenzol Dehydrogenase

Stickstoffmonoxid (NO) ist eine niedermolekulare Verbindung, welches unter bestimmten Bedingungen mit vielen Schlüssel-Biomolekülen reagiert, wie zum Beispiel Metallo-Proteinen oder Thiolgruppen von Proteinen (Cooper, 1998). NO kann an die meisten Übergangsmetalle binden, jedoch ist die Interaktion mit Eisen wohl am besten untersucht.

Bei der Ethylbenzol Dehydrogenase bewirkt NO eine Inhibition des Enzyms, wobei eine gleichzeitige Inaktivierung nicht ausgeschlossen werden kann (Ergebnisse 2.2.4.). Spektroskopische Analysen des Enzyms in Gegenwart von NO bestätigen eine Interaktion mit dessen Eisen-Schwefel-Zentren und vermutlich auch mit dem Häm *b*-Kofaktor (Ergebnisse 3.3.3. und 3.3.4.). Vor allem war ein Effekt von NO auf das [3Fe-4S]-Zentrum zu erkennen, dessen ESR-Signal sich unter NO-Einfluss deutlich ändert und kleiner wird. Am interessantesten ist allerdings das Auftreten eines komplett neuen ESR-Signals (Ergebnisse 3.3.4.). Dieses Signal zeigt Resonanzen bei $g = 2,041$, $g_{(\text{Zentrum})} = 2,034$, $g = 2,024$ und $g = 2,016$ und ist innerhalb eines sehr großen Temperaturbereiches (10 K-120 K) ESR-aktiv. Die Resonanz bei $g = 2,041$ ist bei 100 mW ab 40 K am stärksten ausgeprägt. Aufgrund dieses Temperaturoptimums könnte man davon ausgehen, dass dieses Signal von Mo(V) des *bis*-MoMGD-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase ausgelöst wird. Mo(V)-Signale lassen sich in diesem Temperaturbereich messen (Rothery *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 1978; Magalon *et al.*, 1998). Doch der Vergleich mit Resonanzen von Molybdän-Kofaktoren anderer Molybdänenzyme, wie zum Beispiel dem Mo(V)-Signal der Nitratreduktase NarGHI von *Escherichia coli* (Magalon *et al.*, 1998) oder der Dimethylsulfid Dehydrogenase von *Rhodovulum sulfidophilum* (McDevitt *et al.*, 2002) zeigt, dass die Resonanzen dieses neuen Signals nicht denen anderer Mo(V)-Kofaktoren entsprechen, die im Bereich von $g \approx 1,96$ bis $g \approx 2,01$ liegen. Auch die Resonanzen der Mo(V)-Spezies der Ethylbenzol Dehydrogenase, die bei der Redoxtitrationsreihe detektiert wurden und durch Messung bei höherer Temperatur (60 K) vom [3Fe-4S]¹⁺-Signal isoliert werden konnten (Ergebnisse 4.3.) liegen in einem anderen Bereich. Allerdings könnte die Bindung von NO an den Molybdän-Kofaktor eine Verschiebung des Signals in andere g -Bereiche auslösen. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das NO an eines der Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase bindet. Die mitochondriale Aconitase und der Transkriptionsregulator FNR von *Escherichia coli* zeigen in Gegenwart von NO ein ähnliches ESR-Signal mit Resonanzen bei $g = 2,037$, $g_{(\text{Zentrum})} = 2,031$ und $g = 2,012$ für Aconitase und $g = 2,038$, $g_{(\text{Zentrum})} = 2,034$ und $g = 2,017$ für FNR (Kennedy *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2002). Beide Signale wurden bei einer Temperatur von 77 K detektiert. Die Resonanz bei $g \approx 2,04$ ist charakteristisch für die Bildung eines Dinitrosyl-Eisen-Thiol-Komplexes (DNIC) (Abbildung 76).

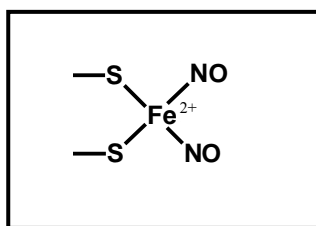


Abbildung 76: Dinitrosyl-Eisen-Thiol-Komplex.

Bei der Aconitase wie auch bei FNR wird dieses Signal durch eine Interaktion von NO mit einem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum verursacht (Kennedy *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2002; Bastian, *et al.*, 2002). Durch den Verlust eines Eisenatoms wird das $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum der Aconitase in ein $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrum überführt (Kennedy *et al.*, 1997). Im Falle von FNR wird postuliert, dass NO das $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum in zwei $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentren zerlegt (Cruz-Ramos *et al.*, 2002). Im Anschluss daran wird eine dimere und eine monomere Dinitrosyl-Eisen-Cystein-Form gebildet, wobei nur die monomere Form ESR-aktiv ist. Möglicherweise bewirkt NO auch bei der Ethylbenzol Dehydrogenase den Zerfall von $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren in $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentren. Die Interaktion von NO mit dem Häm-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase ist eher unwahrscheinlich, da laut der Struktur sich dort keine freie Bindungsstelle für NO befindet (Diskussion 1.3.).

2.3. Die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Ethylbenzol Dehydrogenase

Gereinigte, reduzierte Ethylbenzol Dehydrogenase wird innerhalb einer Halbwertszeit von sieben Minuten durch Sauerstoff inaktiviert (Kniemeyer *et al.*, 2001a). Vermutlich bildet der reduzierte Häm *b*-Kofaktor durch Übertragung von Elektronen auf Luftsauerstoff reaktive Sauerstoff-metabolite, welche das Enzym schädigen. Einer davon ist möglicherweise Wasserstoffperoxid. Die gefundene irreversible Inaktivierung des Enzyms durch Wasserstoffperoxid untermauert diese Hypothese (Ergebnisse 2.2.3.). Jedoch war die nötige Konzentration an H_2O_2 für die vollständige Inaktivierung im Vergleich zur eingesetzten Enzymkonzentration um ein vielfaches höher, so dass vermutlich keine stöchiometrische Beziehung zwischen der eingesetzten H_2O_2 Konzentration und inaktivierten Kofaktoren besteht. Dennoch zeigten Differenz-UV-Vis-Spektren des H_2O_2 -behandelten Enzyms eine Abnahme der Resonanzen der Eisen-Schwefel-Zentren und auch des Häm *b*-Kofaktors. Die Kofaktoren des Enzyms werden also offenbar durch H_2O_2 beeinflusst (Ergebnisse 3.3.2.). Darüber hinaus zeigte ein Vergleich des ESR-Spektrums von unbehandeltem mit H_2O_2 -behandeltem Enzym, dass das $[3\text{Fe-4S}]$ -Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase durch H_2O_2 beschädigt wird. Das ESR-Signal dieses Zentrums wurde deutlich kleiner und verlor zusätzlich eine Resonanz bei $g = 2,024$.

2.4. Die Kofaktoren der Ethylbenzol Dehydrogenase: Redox- und spektroskopische Eigenschaften

Die Präsenz von mehreren Eisen-Schwefel-Zentren, einen Molybdän-Kofaktor und einem Häm *b* in der Ethylbenzol Dehydrogenase war bereits zu Beginn dieser Arbeit durch Metallanalysen, UV-Vis- und Fluoreszenz-spektroskopische Analysen, Aktivitätsfärbungen und die nahe Verwandtschaft zur Selenatreduktase von *Thauera selenatis* bekannt (Kniemeyer *et al.*, 2001a;

Johnson *et al.*, 2001; Szaleniec *et al.*, 2003).

2.4.1. Die Eisen-Schwefel-Zentren der Ethylbenzol Dehydrogenase

Fünf Eisen-Schwefel-Zentren (FS0-FS4) wurden in der Ethylbenzol Dehydrogenase identifiziert (Ergebnisse Kristallisation). Eines befindet sich in der Alpha-, die anderen vier in der Beta-Untereinheit. Funktionell gehören sie zu drei Klassen, mit deutlich unterschiedlichen Redoxbedingungen. Zur Klasse mit hohen Potentialen gehört ein $[3\text{Fe-4S}]^{+1, 0}$ -Zentrum, welches im oxidierten Zustand via ESR-Spektroskopie detektierbar ist (Ergebnisse 4.1.). Dieses $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrum FS4 besitzt ein axiales ESR-Signal mit $g_x = 2,028$ und $g_{y/z} = 2,016$ und sein Mittelpunkt Redoxpotential beträgt + 70 mV (Ergebnisse 4.1.1.; Abbildung 40). Ähnliche Resonanzen wurden bei anderen TypII-Enzymen gefunden, wie zum Beispiel der Nitratreduktase NarGHI (Magalon, *et al.*, 1997; Rothery *et al.*, 1998) bzw. dem löslichen NarGH-Teilenzym, (Blasco *et al.*, 2001) von *Escherichia coli*, der Nitratreduktase von *Haloarcula marismortui* (NarGH; Yoshimatsu *et al.*, 2002) und der Dimethylsulfid Dehydrogenase von *Rhodovulum sulfidophilum* (DdhABC); McDevitt, *et al.*, 2002). Ein Vergleich mit den Redoxpotentialen anderer TypII Enzyme ergab, dass dasjenige von FS4 dem des löslichen NarGH-Teilenzyms ähnelt, welches +60 mV beträgt (Tabelle 38, Blasco *et al.*, 2001).

Tabelle 38: Mittelpunkt-Redoxpotential der Eisen-Schwefel-Zentren von TypII-Enzymen.

Protein	FS0	FS1	FS2	FS3	FS4	Referenz
EBDH	?	-15 mV	-400 mV	-8 mV	+70 mV	diese Arbeit
NarGHI	-55 mV	+130 mV	-420 mV	-55 mV	+180 mV	Rothery <i>et al.</i> , 1998 Rothery <i>et al.</i> , 2004
NarGH	?	+60 mV	-400 mV	-200 mV	+80 mV	Blasco <i>et al.</i> , 2001

Moderate Redoxpotentiale wurde bei zwei $[4\text{-Fe-4S}]^{2+, 1+}$ -Zentren mit Mittelpunkt-Redoxpotentialen von $-15 \pm 6,6$ mV (FS1) und -8 mV (FS3) gefunden (Ergebnisse 4.1.2.). Beide sind im reduzierten Zustand bei Redoxpotentialen unter + 116 mV detektierbar und haben rhombische Signale, mit $g_z = 2,050$ $g_y = 1,950$ und $g_x = 1,885$ für FS1 und Teile eines rhombischen Signals mit $g = 2,071$ und $g = 1,910$ für FS3. Die Lage der Resonanzen des FS1-Zentrums stimmen nahezu mit den Resonanzen des entsprechenden Redoxzentrums der NarGHI überein (Rothery *et al.*, 2004), während sich die Redoxpotentiale der Zentren erheblich unterscheiden (Tabelle 38). Auch in diesem Fall liegt aber das Redoxpotential des löslichen NarGH-Teilenzyms näher an den Werten der Ethylbenzol Dehydrogenase.

Für das $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum FS3 wurden vergleichbare Resonanzen bei Formiat Dehydrogenase von *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (McDevitt *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 1997), welche

zur Subfamilie I der DMSO-Reduktase Familie gehört, und der Formiat Dehydrogenase von *Desulfovibrio alaskensis* (Brondino *et al.*, 2004) gefunden. Genau entsprechende Resonanzen zu denen von FS3 der NarGHI ($g_z=2,04$, $g_y=1,96$, $g_x=1,88$), welche in einer Δ FS1-Mutanten detektiert wurden (Rothery *et al.*, 2004), wurden bei der Ethylbenzol Dehydrogenase nicht gefunden. Zur dritten Klasse der Fe-S Zentren mit niedrigen Redoxpotential lässt sich das Eisen-Schwefel-Zentrum FS2 zuordnen. Es handelt sich hier wiederum um ein $[4\text{-Fe-4S}]^{2+, 1+}$ -Zentrum, welches erst unter extrem reduzierten Bedingungen ESR-aktiv wird. Dies kann allerdings nur indirekt beobachtet werden, da bei Redoxpotentialen unter -374 mV alle bis dahin beobachteten Signale verschwinden und stattdessen ein sehr breites magnetisch-gekoppeltes ESR-Signal auftritt (Ergebnisse 4.1.2.; Abbildung 45). Dieses Verhalten wurde bei ähnlichem Mittelpunkt-Redoxpotential (<-400 mV) auch bereits bei NarGHI beobachtet und als Ergebnis der magnetischen Kopplung der drei nahe benachbarten Zentren FS1-3 interpretiert (Ergebnisse 4.1.2.; Guigliarelli *et al.*, 1992; Magalon *et al.*, 1998). Das niedrige Redoxpotential des FS2-Zentrums stellt auf den ersten Blick eine endergone Barriere für die Reaktion der Ethylbenzol Dehydrogenase dar, die die Reaktion limitiert. Beim FS4-Zentrum der Nitratreduktase NarGHI wurde zuerst diskutiert, dass es womöglich nicht am Elektronentransport beteiligt ist und andere Weg für den Elektronentransfer durch das Protein eingeschlagen werden (Guigliarelli *et al.*, 1996). Jedoch zeigten die Strukturen der Nitratreduktase (Bertero *et al.*, 2003; Yormakka *et al.*, 2004) und auch diejenige der Ethylbenzol Dehydrogenase (Ergebnisse 1.3.; Diskussion 1.) das Gegenteil. Die Redoxzentren der Proteine sind wie in einer Kette angeordnet und der Verlust eines Zentrums würde die betreffende Elektronentransfer-Distanz über 15 Å hinaus erhöhen, welches ungünstig für einen direkten Elektronentransfer wäre. Darüber hinaus wurden auch in anderen Oxidoreduktasen Hoch- und Niedrig-Redoxpotential-Zentren entdeckt, welche annehmen lassen, dass diese womöglich normale Teile von physiologischen Elektronentransportketten sind (Page *et al.*, 1999). Die Resonanzen des fünften $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum (FS0), das sich in der Alpha-Untereinheit der Ethylbenzol Dehydrogenase befindet, wurde bisher noch nicht identifiziert. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein ungewöhnliches „High-Spin“-Eisen-Schwefel-Zentrum. Typische „High-Spin“-Zentren haben eine Koordination, die sich aus drei Cysteinen und einer alternativen Aminosäure, wie Aspartat (Duderstadt *et al.*, 1999), Serin (Kowal *et al.*, 1995) oder Histidin (Rothery *et al.*, 2004) zusammensetzt. Wie auch bei der Nitratreduktase ist beim FS0-Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase ein Cystein durch Histidin ausgetauscht (Diskussion 1.1.; Rothery *et al.*, 2004). Ein Sequenzvergleich zeigt, dass dieses Histidin innerhalb der TypII-Familie der DMSO-Reduktase Familie konserviert ist (Abbildung 77, Yoshimatsu *et al.*, 2002; Rothery *et al.*, 2004).

Alle ESR-Signale der Eisen-Schwefel-Zentren sind charakterisiert durch schnelle Relaxationsbedingungen. Ihre Signale wurden unter nicht gesättigten Bedingungen bei 12 K mit 10 mW Mikrowellenleistung gemessen. Jedoch sind die Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Zentren trotz der sehr ähnlichen Struktur (46 % Sequenzähnlichkeit) und ähnlicher Position

(Abweichung $< 0.5 \text{ \AA}$) in den Beta-Untereinheiten von NarGHI und Ethylbenzol Dehydrogenase mit Ausnahme des [4Fe-4S]-Zentrum FS2 sehr unterschiedlich. Das lösliche NarGH-Teilenzym weist größere Übereinstimmungen der Redoxpotentiale der einzelnen Zentren mit denen von Ethylbenzol Dehydrogenase auf. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Redoxpotentiale der Nitratreduktase-Formen wurde diskutiert, ob diese Redoxpotential-Variationen darauf zurückzuführen sind, dass der NarGH-Komplex ohne die NarI Untereinheit eine Konformationsänderung durchmacht (Blasco *et al.*, 2001). Im Hinblick darauf könnten auch kleine Strukturunterschiede völlig andere Redoxpotentiale bedingen.

EbdA_EbN1	KWDKVNWGS HLN ICWPQGSCKFYVYVRNGIVWRE EE QAAQTPACNVVDYVDYNPL GC QKGSA
EbdA2_EbN1	KWDKVTWGS HLN ICWPQGSCKFYVYVRNGIVWRE EE QAAQTAACNPDYVDYNP SGC QKGAA
NarG_Ec	QHDKIVRSTHGVNCT..GSCSWKIYVKNGLV WT ETQQT TDY PRTRPDLNPHEPR GC PRGAS
NarG_Hf	DWDSVSRSTHGVNCT..GSCSWNVYVKNGQVWRE EE QSGDYPRFDESLPDNP RG CQKGAC
NarG_Ha	DWDSVARSTHGVNCT..GSCSWNVYVKD G QVWRE EE QAGDYPTFDESLPDNP RG CQKGAC
Nar_Aeropy	AYDKVARSTHGVNCT..GSCSWMVYVKD G IVAY EL QAGDYPDIGPSYPNYEPR GC PRGAS
Nar_Pyro	QYDKVARSTHGVNCT..GSCSWNVYVKD G LIV WEL QATDYPDISPDIPNYEPR GC PRGAS
SerA_Thau	TWDSTGFITHSNGCV..AGCAWRVVFVKN G VPMRE EE QVSEYPQL.PGV PD MNPR GC QKGAV
ClrA_Ideo	TWDSVGVMT HS NGCV..AGCAWNVVFVKN G IPMRE EE QISKYPQL.PGIP DM NPR GC QKGAV
DdhA_Rhodo	TWDYVGKAA HC INCL..GNCAFDIYVKD G IVIRE EE QLAKYPQISPDIPDANPR GC QKGAI
PcrA_Dechl	SWDKKTRGA HL INCT..GACPHFVYTKD G VVIRE EE QSKDIPPM.PNIPELNPR GC NKGEC

Abbildung 77: Sequenzvergleich der N-terminalen Cystein-Gruppen einiger Molybdänenzyme der Subfamilie Typ II der DMSO-Reduktase Familie. Für die Proteine wurden folgende Abkürzungen verwendet: ClrA, Chloratreduktase; NarG, membran-gebundene respiratorische Nitratreduktase; Nar, periplasmatische Nitratreduktase; EbdA Ethylbenzol Dehydrogenase; PcrA Perchloratreduktase; SerA, Selenatreduktase; DdhA, Dimethylsulfid Dehydrogenase. Abkürzungen für die Organismen sind: Aero, *Aeropyrum pernix K1*; Rhodo, *Rhodovulum sulfidophilum*; Ec, *Escherichia coli*; Thau, *Thauera selenatis*; Dechl, *Dechloromonas aromatica*; Pyro, *Pyrobaculum aerophilum str. IM2*; Ideo, *Ideonella dechloratans*; Ha, *Haloarcula marismortui*; EbN1; *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1. Die konservierten Liganden C (Cystein) bzw. H (Histidin) des [Fe-S]-Zentrums FS0 sind grau unterlegt.

2.4.2. Der Molybdän-Kofaktor und der Häm b-Kofaktor der Ethylbenzol Dehydrogenase

Der Molybdän- und der Häm *b*-Kofaktor sind diejenigen, welche sich am Anfang bzw. am Ende der Elektronentransportkette in der Ethylbenzol Dehydrogenase befinden. Die Elektronen werden vom Molybdän-Kofaktor aufgenommen und vom Häm *b* wieder abgegeben, nachdem sie durch das gesamte Protein geleitet wurden. Dieselbe Situation ist auch bei der NarGHI anzufinden, mit dem Unterschied, dass dort der Elektronenfluss umgekehrt ist (Bertero *et al.*, 2003; Yormakka, *et al.*, 2004). Aufgrund der ähnlichen Struktur und Anordnung der Redoxzentren sind die Potentiale der Redoxpaare $\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$ (+223 mV) und $\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$ (+82 mV) der Ethylbenzol Dehydrogenase, wie zu erwarten, denen von NarGHI ($\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$ (+200 mV) und $\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$ (+100 mV) sehr ähnlich. Das Redoxpotential des Häm *b*-Kofaktors der Ethylbenzol Dehydrogenase beträgt +256 mV (Ergebnisse 5.) und passt sehr gut zu den bisherigen biochemischen Daten der Ethylbenzol Dehydrogenase. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Oxidation von Ethylbenzol (Ethylbenzol/Phenylethanol $E^0 = +0,03 \text{ V}$) nur an künstliche Elektronenakzeptoren koppeln lässt,

welche ein sehr hohes Redoxpotential besitzen (Ferrizinium/Ferrozen, $E^\circ = +0,38 \text{ V}$), wurde ein hohes Ausgangspotential erwartet (Kniemeyer *et al.*, 2003). Zusätzlich lässt sich mit diesem hohen Häm-Potential auch die Hypothese unterstützen, dass der natürliche Elektronenakzeptor ein periplasmatisches Cytochrom c ist.

3. Verwendung der Broad-Host-Range-Hybridvektoren pBBR1-MCS4/pTrc99a/NdeI und pBBR1-MCS4/pTrc99a/NcoI

Durch die Herstellung der zwei „Broad-Host-Range“-Hybridvektoren (Ergebnisse 6.), der sowohl in *Escherichia coli* als auch in anderen Gram-negativen Bakterien, wie zum Beispiel *Aromatoleum aromaticum* zur Expression der Gene der Ethylbenzol Dehydrogenase eingesetzt werden kann, wird es möglich sein, die Funktion des Enzyms weiter aufzuklären. Zum Beispiel könnten Mutationsstudien am katalytischen Zentrum der Ethylbenzol Dehydrogenase durchgeführt werden, um weiteren Aufschluss über den Reaktionsmechanismus zu erhalten. Des weiteren könnten einzelne Redoxzentren des Enzyms durch Knock-out Experimente, studiert werden, um den ungewöhnlichen Elektronenfluss über Hoch- und Niedrig-Potential-Zentren weiter aufzuklären. Darüber hinaus wurden Gene für ein zweites Ethylbenzol Dehydrogenase-ähnliches Enzym im Chromosom von *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 gefunden, dessen Funktion bisher unbekannt ist (Rabus *et al.*, 2002) und das als rekombinantes Protein charakterisiert werden soll. Zusätzlich ist auch das Studium der Reifungsprozesse und Transport des Molybdänenzym ins Periplasma interessant, welcher über ein Zwei-Vektorensystem direkt in verwandten Bakterien untersucht werden könnte.

4. Die rekombinante Benzoylacetat-CoA Ligase - Bal_{N-HP-Thio/C-His6}

Aufgrund der schwierigen Reinigungsbedingungen der Benzoylacetat-CoA Ligase aus Zellen von *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 wurde das Protein rekombinant mit einer C-terminalen His-Tag-Fusion und einem fusionierten N-terminalen Histidin-Patch-Thioredoxins in *Escherichia coli* produziert (Ergebnisse 7.). Diese rekombinant-hergestellte Bal_{N-HP-Thio/C-His6} zeigte eine 20-fach höhere spezifische Aktivität im Rohextrakt des Überproduktionsstamms als Benzoylacetat-CoA Ligase aus *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 (Ergebnisse 7.4.). Erstaunlich war, dass sich das Enzym nach fraktionierter Fällung mit Ammoniumsulfat bei 60 %-Ammoniumsulfat-Sättigung noch in der löslichen Fraktion befand, wohingegen das Enzym aus dem Wildtyp bei 60 %-Ammoniumsulfat-Sättigung ausfällt. Vermutlich verursacht das N-terminal-fusionierte Histidin-Patch-Thioredoxin, dass sich das rekombinante Protein länger in Lösung hält.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Å	Angström
AA	Aminosäuren
Ac	Acetyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c	Konzentration
°C	Grad-Celsius
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
[I]	Inhibitorkonzentration
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
kb	Kilobasenpaar
K _m	Michaelis-Menten Konstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
lac	Lactose
Lambda: λ	Wellenlänge
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
m	Meter
mAU	milli Absorption Units
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure

min	Minute
mS	milli Siemens
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
P _i	Phosphat
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur
[S]	Substratkonzentration
SAD	„single wavelenght anomalous diffraction“
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
ÜNK	Übernachtskultur
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

LITERATURVERZEICHNIS

AHLERS, J., ARNOLD, A., VON DÖHREN, F.R., and PETER, H.W. (1982). Enzymkinetik, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag.

AMANN, E., OCHS, B., and ABEL, K.J. (1988). Tightly regulated tac promotor vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**: 301-315.

ARNOUX, P., SABATY, M., ALRIC, J., FRANGIONI, B., GIOGLIARELLI, B., ADRIANO, J.-M., and PIGNOL, D. (2003). Structural and redox plasticity in the heterodimeric periplasmatic nitrate reductase. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 928-934.

BARTHOLOMÄ, C. (2004). Schüsselenzyme des anaeroben Toluol- und Ethylbenzostoffwechsels: Versuche zur heterologen Produktion. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br..

BASTIAN, N.R., FOSTER M.J.P., BALLANTYNE, M., and LU, X. (2002). Nitrogen oxides, the good, the bad und the ugly. *Current topics in biophysics*, **26**: 115-127

BERKS B.C., SARGENT F., and PALMER T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**: 260–274.

BERTERO, M.G., ROTHERY, R.A., PALAK, M., HOU, C., LIM, D., BLASCO, F., WEINER, J.H., and STRYNADKA, N.C.J. (2003). Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 681-687.

BALL, H.A., JOHNSON, H.A., REINHARD, M., and SPORMANN, A.M. (1996). Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* **178**: 5755-5761.

BLASCO, F., GUIGLIARELLE, A., MAGALON, A., ASSO, M., GIODANO, G., and ROTHERY, R. A. (2001). The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 179-193.

BOLL, M., and FUCHS, G. (1995). Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism – ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**: 921-933.

BOYINGTON, J.C., GLADYSHEV, V.N., KHANGULOV, S.V., STADTMAN, T.C., and SUN, P.D. (1997). Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. *Science* **275**: 1305-1308.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

BRONDINO, C.B., PASSEGGI, M.C.G., CALDEIRA, J., ALMENDRA, M.J., FEIO, M.J., MOURA, J.J.G., and MOURA, I. (2004). Incorporation of either molybdenum or tungsten into formate dehydrogenase from *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491; EPR assignment of the proximal iron-sulfur cluster to the pterin cofactor in formate dehydrogenase from sulfate-reducing bacteria. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**: 145-151.

BRÜNGER, A.T., ADAMS, P.D., CLORE, G.M., DELANO, W.L., GROS, P., and GROSSE-KUNSTLEVE, R. W. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallography* **54**: 905-921

COOPER, C.E. (1998). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**: 290-309.

CORNISH-BOWDEN, A. (1995). Analysis of Enzyme Kinetic Data. Oxford University Press.

COSTA, C., TEIXEIRA, M., LEGALL, J., MOURA, J.J.G., and MOURA, I. (1997). Formate dehydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: isolation and spectroscopic characterization of the active site (heme, iron-sulfur centers and molybdenum). *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**: 198-208.

CRUZ-RAMOS, H., CRACK, J., WU, G., HUGHES, M.N., SCOTT, C., THOMSON, A.J., GREEN, J., and POOLE, R.K. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-toxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* **21**: 3235-44.

CZJEK, M., DOS SANTOS, J.P., POMMIER, J., GIORDANO, G., MEJEAN, V., and HASER, R. (1998). Crystal structure of oxidized trimethylamin N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **284**: 435-447.

DAVISON, J. (2002). Genetic tools for pseudomonads, rhizobia and other gram-negative bacteria. *BioTechniques* **32**: 386-401.

DIAS, J.M., THAN, M.E., HUMM, A., HUBER, R., BOURENKOV, G.P., BARTUNIK, H.D., BURSAKOV, S., CALVETE, J., CALDEIRA, J., CARNEIRO, C., MOURA, J.J., MOURA, I., and ROMAO, M.J. (1999). Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure* **7**: 65-79.

DIMMELER, S., and BRIINE, B. (1993). Nitric oxide preferentially stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase compared to alcohol or lactate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **315**: 21-24.

DUDERSTADT, R.E., BRERETON, P.S., ADAMS, M.W., and JOHNSON, M.K. (1999). A pure $S = 3/2 [Fe_4S_4]^+$ cluster in the A33Y variant of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin, *FEBS Lett.* **454**: 21-26.

EINSLE, O., NIESSEN, H., ABT, D.J., SEIFFERT, G., SCHINK, B., HUBER, R., MESSERSCHMIDT, A., and KRONECK, P.M. (2004). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tungsten-dependent acetylene hydratase from *Pelobacter acetylenicus*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**: 299-301.

ELLIS, P.J., CONRAD, T., HILLE, R., and KUHN, P. (2001). Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **9**: 125-132.

EMSLEY, P., and COWTAN, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallography* **60**: 2126-2132.

FENN, T.D., RINGE, D., and PETSCH, G.A. (2003). POVScript+: A program for model and data visualization using persistence of vision ray-tracing. *J. Appl. Crystallogr.* **36**: 944-947.

FISCHER, B., ENEMARK, J.H., and BASU, P. (1998). A chemical approach to systematically designate the pyranopterin centers of molybdenum and tungsten enzymes and synthetic models. *J. Inorgan. Biochem.* **72**: 13-21.

FUKAHORI, M., ISCHIMORI, K., ISHIDA, H., NAKAZAWA, H., and OKINO, H. (1994). Nitric oxide reversible suppresses xanthine oxidase activity. *Free Radikal Biol. Med.* **18**: 869-875.

GAYDA, J. P., GIBSON, J. F., CAMMACK, R., HALL, D. O., and MULLINGER, R. (1976). Spin lattice relaxation and exchange interaction in a 2-iron, 2-sulphur protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **434**: 154-63

GRANUM, P.E., and WHITAKER, J.R. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* **109**: 156-159.

GUIGLIARELLI, B., ASSO, M., MORE, C., AUGIER, V., BLASCO, F., POMMIER, J., GIORDANO, G., and BERTRAND, P. (1992). EPR and redox characteristics of iron-sulfur centers in nitrate reductase A and Z from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **207**: 61-68.

HAGEL, C. (2003). Charakterisierung der Benzoylacetat-CoA Ligase ein Enzym des anaeroben Ethylbenzol-Abbauweges von *Azoarcus sp.* Stamm EbN1. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

HALLBERG, B.M., BERGFORS, T., BÄCKBRO, K., PETTERSSON, G., HENRIKSSON, G., and DIVNE, C. (2000). A new scaffold for binding haem in the cytochrome domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. *Structure* **8**: 79-88.

HETTMANN, T., SIDDIQUI, R.A., VON LANGEN, J., FREY, C., ROMAO, M.J., and DIEKMANN, S. (2003). Mutagenesis study on the role of a lysine residue highly conserved in formate dehydrogenases and periplasmic nitrate reductases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**: 40-47.

HEUKESHOVEN, J., and DERNICK, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis.* **9**: 28-32.

HILLE, R. (1996). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**: 2757-2816.

HILLE, R. (1999). Molybdenum enzymes. *Essays in Biochemistry.* **34**: 125-137.

HILLE, R., RETEY, J., BARTLEWSKI-HOF, U., REICHENBECHER, W., and SCHINK, B. (1999). Mechanistic aspects of molybdenum-containing enzymes. *FEMS, Microbiology Reviews* **22**: 489-501.

HILLE, R. (2002). Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 360-367.

HOLM, L., and SANDER, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**: 123-138.

IWATA, S., SAYNOVITS, M., LINK, T.A., and MICHEL, H. (1996). Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure* **4**: 567-579.

JANCARIK, J., and KIM, S.H. (1991). Sparse-matrix sampling a screening method for crystallisation of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**: 409-411.

JOBST, B. (2005). Biochemie der Acetophenon Carboxylase, eines Schlüsselenzyms des anaeroben Ethylbenzol-Stoffwechsels. Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br..

JOHNSON, H.A., PELLETIER, D.A., and SPORMANN, A.M. (2001). Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J. Bacteriol.* **183**: 4536-4542.

JOHNSON, J.L., REES, D., and ADAMS, M.W.W. (1996). Tungstoenzymes. *Chem. Rev.* **96**: 2817-2839.

JORMAKKA, M., RICHARDSON, D., BYRNE, B., and IWATA, S. (2004). Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure* **12**: 95-104.

JORMAKKA, M., TÖRNROTH, S., BYRNE, B., and IWATA, S. (2002). Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science* **295**: 1863-1868.

KABSCH, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**: 795-800.

KENNEDY, M.C., ANTHOLINE, W.E., and BEINERT, H. (1997). An EPR investigation of the products of the reaction of cytosolic and mitochondrial Aconitase with nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **272**: 20340-20347.

KHANGULOV, S.V., GLADYSHEV, V.N., DISMUKES, G.C., and STADTMAN, T.C. (1998). Selenium-containing formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*: a molybdopterin enzyme that catalyzes formate oxidation without oxygen transfer. *Biochemistry.* **37**: 3518-28.

KISKER, C., SCHINDELIN, H., and REES, C.D. (1997). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structures and mechanism. *Annu.Rev.Biochem* **66**: 233-267.

KNIEMEYER, O., and HEIDER, J. (2001a). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**: 21381-21386.

KNIEMEYER, O., and HEIDER, J. (2001b). (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch. Microbiol.* **176**: 129-135.

KNIEMEYER, O., FISCHER, T., WILKES, H., GLOCKNER, F.O., and WIDDEL, F. (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 760-768.

KOWAL, A.T., WERTH, M.T., MANADORI, A., CECCHINI, G., SCHRÖDER, I., GUNSALUS, R.P., and JOHNSON, M.K. (1995). Effect of cysteine to serine mutations on the properties of the [4Fe-4S] center in *Escherichia coli* fumarate reductase. *Biochemistry* **34**: 12284-12293.

KOVACH, M. E., ELZER, P. H., HILL, D. S., ROBERTSON, G. T., FARRIS, M. A., ROOP, R. M., and PETERSON, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.

KRAFFT, T., BOKRANZ, M., KLIMMEK, M., SCHRODER I., FAHRENHOLZ, F., KOJRO, E., and KROGER A. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *psrA* gene of *Wollinella succinogenes* polysulfide reductase. *Eur. J. Biochem.* **206**: 503-510.

KRAFFT, T., BOWEN, A., THEIS, F., and MACY, J.M. (2000). Cloning and sequencing of the genes encoding the periplasmic-cytochrome *b*-containing selenate reductase of *Thauera selenatis*. *DNA Seq.* **10**: 365-377.

LÄMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LAEMPE, D., JAHN, M., and FUCHS, G. (1999). 6-hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA-dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **263**: 420-429.

LATSCHA, H.P., KAZMAIER, U., and KLEIN, H.A. (2002). Chemie für Biologen. Springer Verlag Berlin.

LLEDÓ, B., MARTINEZ-ESPINOSA, R.M., MARHUENDA-EGEA, F.C., and BONETE, M.J. (2004). Respiratory nitrate reductase from *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1674**: 50-59.

LEPOIVRE, M., FIESCHI, F., and COVES, J. (1991). Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 442-448.

LEUTWEIN, C., and HEIDER, J. (1999). Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology* **145**: 3265-3271.

MAGALON, A., LEMESLE-MEUNIER, D., ROTHERY, R. A., FRIXON, C., WEINER, J.H., and BLASCO, F. (1997). Heme axial ligation by the highly conserved His residues in helix II of cytochrome *b* (NarI) of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI). *J. Biol. Chem.* **272**: 25652-25658.

MAGALON, A., ASSO, M., GUIGLIARELLI, B., ROTHERY, R.A., BERTRAND, P., GIORDANO, G., and BLASCO, F. (1998). Molybdenum cofactor properties and [Fe-S] cluster coordination in *Escherichia coli* Nitrate Reductase A: Investigation by site-directed mutagenesis of the conserved His-50 residue in the NarG subunit. *Biochemistry*. **37**: 7363-7370.

MACEDO-RIBEIRO, S., MARTINS, B.M., PEREIRA, P.J.B., BUSE, G., HUBER, R., and SOULIMANE, T. (2001). New insights into the thermostability of bacterial ferredoxins: high-resolution crystal structure of the seven-iron ferredoxin from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**: 663-674.

MENDEL, R., and SCHWARZ, G. (1999). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**: 33-69.

MCALPINE, A.S., MCEWAN, A.G., and BAILEY, S. (1998). The high resolution crystal structure of DMSO reductase in complex with DMSO. *J. Mol. Biol.* **275**: 613-623.

MCDEVITT, C.A., HUGENHOLTZ, P., HANSON, G.R., and MCEWAN, A.G. (2002). Molecular analysis of dimethyl sulphide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*: its place in the dimethyl sulphoxide reductase family of microbial molybdopterin-containing enzymes. *Mol. Microbiol.* **44**: 1575-1587.

MCDEVITT, C.A., HANSON, G.R., NOBLE, C.J., CHEESMAN, M.R., and MCEWAN, A.G. (2002). Characterization of the redox centers in dimethyl sulfide dehydrogenase from *Rhodovulum sulfidophilum*. *Biochemistry* **41**: 15234-44.

MESSERSCHMIDT, A., NIESSEN, H., ABT, D., EINSLE, O., SCHINK, B., and KRONECK, P.M.H. (2004). Crystal structure of pyrogallol-phloroglucinol transhydroxylase, an Mo enzyme capable of intermolecular hydroxyl transfer between phenols. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **101**: 11571-11576.

MILLER, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Springs Habor Laboratory. Cold Spring Habor, New York.

MURSHUDOV, G.N., VAGIN, A.A., and DODSON, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallography*. **53**: 240-255.

NADARAJAN, K., JOSHI, H.K., CHAUDHURY, P.K., PAL, K., COONEY, J.J., ENEMARK, J.H., and SARKAR, S. (2004). Structural and functional analogue of the active site of polysulfide reductase from *Wolinella succinogenes*. *Inorg. Chem.* **43**: 4532-3.

NOTENBOOM, V., BORASTON, A.B., KILBURN, D.G., and ROSE, D.R. (2001). Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry* **40**: 6248-6256.

ORRINGER E.P., and ROER M.E. (1979). An ascorbate-mediated transmembrane-reducing system of the human erythrocyte. *J. Clin. Invest.* **63**: 53-58.

OTWINOWSKI, Z. (1991). In Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Isomorphous replacement and anomalous scattering, W. Wolf, P.R. Evans, and A.G.W. Leslie, eds. (Warrington: Daresbury Laboratory): 80-86.

PERRAKIS, A., MORRIS, R., and LAMZIN, V.S. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nature Struct. Biol.* **6**: 458-463.

PFENNIG, N. (1978). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring shaped, vitamin B₁₂-requiring member of the family Rhodospirillaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 238-288.

PIERSON, D.E., and CAMPBELL, A. (1990). Cloning and nucleotide sequence of *bisC*, the structural gene for biotin sulfoxide reductase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 2194-2198.

PAGE, C.C., MOSER, C.C., CHEN, X., and DUTTON, P.L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**: 47-52.

POIROT, O., SUHRE, K., ABERGEL, C., O'TOOLE, E., and NOTREDAME, C. (2004). 3DCoffee@igs: a web server for combining sequences and structures into a multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* **32**: W37-40.

RABUS, R., and WIDDEL, F. (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**: 96-103.

RABUS, R. (1995). Anaerober Abbau von Alkylbenzolen und Rohöl durch nitratreduzierende und sulfatreduzierende Bakterien. Dissertation an der Universität Bremen.

RABUS, R., and HEIDER, J. (1998). Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* **170**: 377-384.

RABUS, R., KUBE, M., BECK, A., WIDDEL, F., and REINHARDT, R. (2002). Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **178**: 506-516.

RABUS, R., KUBE, M., HEIDER, J., BECK, A., HEITMANN, K., WIDDEL, F., and REINHARDT, R. (2005). The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **183**: 27-36.

RHEE, SK., and FUCHS, G. (1999). Phenylacetyl-CoA:acceptor oxidoreductase, a membrane-bound molybdenum-iron-sulfur enzyme involved in anaerobic metabolism of phenylalanine in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **262**: 507-515.

ROTHERY, R.A., BERTERO, M.G., CAMMACK, R., PALAK M., BLASCO, F., STRYNADKA, N.C.J., and WEINER, J.H. (2004). The catalytic subunit of *Escherichia coli* Nitrate Reductase A contains a Novel [4Fe-4S] Cluster with a high-spin ground state. *Biochemistry* **43**: 5324-5333.

RICHARDSON, D.J., BERKS, B.C., RUSSELL, D.A., SPIRO, S., and TAYLOR, C.J. (2001). Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 165-178.

SARGENT F, BERKS B.C., and PALMER T. (2002). Assembly of membranebound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch. Microbiol.* **178**:77-84

SAMBROOK, T., FRISCH, E.F., and MANIATIS, J. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.*

SCHRÖTER, W., LAUTENSCHLÄGER, K., and BIBRACK, H. (1995). Taschenbuch der Chemie. *Verlag Harri Deutsch.*

SIMON, R., PRIEFER, U., and PÜHLER, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negativ bacteria, in: *Biotechnology* **1**: 784-791.

SCHINDELIN, H., KISKER, C., HILTON, H., RAJAGOPALAN, K.V., and REES, D.C. (1996). Crystal structure of DMSO reductase: redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science* **272**: 1615-1621.

SCHNEIDER, T.R., and SHELDRIK, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallography* **58**: 1772-1779.

SCHRÖDER, I., RECH, S., KRAFFT, T., and MACY, J.M. (1997). Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J.Biol.Chem.* **272**: 23765-23768.

STUEHR, D.J., and NATHAN, C.F. (1989). Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**: 1543-1555.

SCHULTZ, B.E., HILLE, R., and HOLM, R.H. (1995). Direct oxygen atom transfer in the mechanism of action of *Rhodobacter sphaeroides* dimethylsulfoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 827-828.

SCHULZ, G.E. (1992). Binding of nucleotides by proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**: 61-67.

SCHÜTTELKOPF, A.W., and VAN AALTEN, D.M.F. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallography* **60**: 1355-1363.

STROUS, M., PELLETIER, E., MANGENOT, S., RATTEL, T., LEHNER, A., TAYLOR, M.W., HORN, M., DAIMS, H., BARTOL-MAVEL, D., WINCKER, P., BARBE, V., FONKNECHTEN, N., VALLENET, D., SEGURENS, B., SCHENOWITZ-TRUONG, C., MEDIGUE, C., COLLINGRO, A., SNEL, B., DUTILH, B.E., OP DEN CAMP, H.J., VAN DER DRIFT, C., CIRPUS, I., VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T., HARHANGI, H.R., VAN NIFTRIK, L., SCHMID, M., KELTJENS, J., VAN DE VOSSENBERG, J., KARTAL, B., MEIER, H., FRISHMAN, D., HUYNEN, M.A., MEWES, H.W., WEISSENBAACH, J., JETTEN, M.S., WAGNER, M., and LE PASLIER, D. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790-794.

SZALENIEC, M., JOBST, B., and HEIDER, J. (2003). Ethylbenzene dehydrogenase: oxidation of hydrocarbons without oxygen. *Ann. Pol. Chem. Soc.* 2003 240-245.

SZALENIEC, M., WITKO, M., TADEUSIEWICZ, R., and GOCLON, J. (2006). Application of artificial neural network and DFT-based parameters for prediction of reaction kinetics of ethylbenzene dehydrogenase. *J. Comput Aided Mol Des.* **20**: 145-157.

TERWILLIGER, T.C. (2000). Maximum likelihood density modification. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallography* **56**: 965-972.

MURRAY, M.G., and THOMPSON, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325.

THORELL, H. D., STENKLO, K., KARLSSON, J., and NILSSON, T. (2003). A Gene Cluster for Chlorate Metabolism in *Ideonella dechloratans*. *Applied and enviromental microbiology.* **69**: 5585–5592.

VINCENT, S.P., and BRAY, R.C. (1978). Electron paramagnetic resonance studies on nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **171**: 639-647.

VOLBEDA, A., CHARON, M.H., PIRAS, C., HATCHIKIAN, E.C., FREY, M., and FONTECILLA-CAMPS, J.C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**: 580-587.

YOSHIMATSU, K., SAKURAI, T., and FUJIWARA, T. (1999). Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a dinitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. *FEBS letters* **470**: 216-220.

YOSHIMATSU, K., IWASAKI, T., and FUJIWARA, T. (2002). Sequence and electron paramagnetic resonance analyses of nitrate reductase NarGH from a denitrifying halophilic euryarchaeote *Haloarcula marismortui*. *FEBS letters* **516**: 145-150.

YOUNG, A.C.M., VALADON, P., CASADEVALL, A., SCHARFF, M.D., and SACCHETTINI, J.C. (1997). The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes. *J. Mol. Biol.* **274**: 622-634.

ZEHR, B.D., SAVIN, T.J., and HALL, R.E. (1989). A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **182**: 157-159.

ZIEGLER K., BRAUN K., BÖCKLER A., and FUCHS G. (1987). Studies on anerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch. Microbiol.* **149**: 62-69.

DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Heider für die Bereitstellung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Fuchs für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hervorragenden Arbeitsbedingungen während meiner Zeit in Freiburg.

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer und ihrer gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung, die sie uns in Darmstadt entgegengebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Thorsten Friedrich (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg i. Br.) danke ich für die Aufnahme der ESR-Spektren, die Einführung in diese Technik und die angenehme Zusammenarbeit.

Frau Bärbel Blaum aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Friedrich (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg i. Br.) danke ich für die Aufnahme der elektrochemisch-induzierten Redox-Differenzspektren.

Herrn Daniel Kloer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg E. Schulz (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg i. Br.) danke ich für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse und die Strukturaufklärung.

Thanks to Maciej Szaleniec (Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Science, Krakau, Polen) for his contribution to our good work during kinetic studies of ethylbenzene dehydrogenase.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Victor Gad'on für seine Hilfe bei den Fermenter-Anzuchten in Freiburg i. Br.. Ein Dankeschön an Christa Ebenau-Jehle und Tamara Hess für ihre Hilfe im Laboralltag.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Fuchs und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johann Heider möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, auf deren Unterstützung ich mich stets verlassen kann.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Datum)

(Unterschrift)

Lebenslauf

Corina Hagel

geboren in Heilbronn, 27.02.1976

Schulbildung

1982 - 1984	Grundschule Obersulm-Eschenau
1984 - 1986	Grundschule Obersulm-Affaltrach
1986 - 1995	Justinus-Kerner Gymnasium Weinsberg; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1995 - 1996	Studium Graphik-Design, Kunstschule STIX, Heilbronn
1997 - 1999	Studium der Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Abschluss Vordiplom)
1999 – 2003	Studium der Biologie, Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br., Schwerpunkte Mikrobiologie, Genetik, Zellbiologie und Virologie, (Abschluss Diplom)
2002 – 2003	Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Mikrobiologie, Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br. in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georg Fuchs unter Leitung von PD Dr. Johann Heider. Thema: Charakterisierung der Benzoylacetat-CoA Ligase, ein Enzym des anaeroben Ethylbenzol-Abbauweges von <i>Azoarcus sp.</i> Stamm EbN1.

Weiterführende akademische Ausbildung

seit 08/2003	Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Technische Universität Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. Johann Heider. Thema: Struktur und Funktion der Ethylbenzol Dehydrogenase, einer anaeroben Kohlenwasserstoff-Hydroxylase. Im Zeitraum von 08/2003 bis 07/2005 wurde die Arbeit an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i. Br. und anschließend an der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt.
--------------	--